



TITLE:

大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性に対するニューロトロフィンの保護作用に関する研究(Dissertation\_全文)

AUTHOR(S):

久米, 利明

---

CITATION:

久米, 利明. 大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性に対するニューロトロフィンの保護作用に関する研究. 京都大学, 2001, 博士(薬学)

ISSUE DATE:

2001-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.r10712>

RIGHT:

大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性に対する  
ニューロトロフィンの保護作用に関する研究

2001

久米 利明

大脳皮質におけるグルタミン酸神経毒性に対する  
ニューロトロフィンの保護作用に関する研究

2001

久米 利明

# 目 次

緒言	1
第1章 グルタミン酸神経毒性とホスホリパーゼC- $\delta$ の関連について	4
実験方法	5
実験結果	8
第1節 培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の濃度依存性と機序	8
第2節 PLC- $\delta$ の免疫反応性に対するグルタミン酸の効果	11
考察	13
第2章 脳由来神経栄養因子 (BDNF) によるグルタミン酸神経毒性の制御	15
実験方法	18
実験結果	19
第1節 培養大脳皮質ニューロンにおける TrkB の活性化に対する BDNF の影響	19
第2節 グルタミン酸神経毒性の機序	21
第3節 グルタミン酸神経毒性に対する BDNF の保護作用	22
第4節 カルシウムイオノフォアおよびNOドナー誘発神経毒性に対する BDNF の保護作用	24
考察	26
第3章 神経成長因子 (NGF) によるグルタミン酸神経毒性の制御	28
実験方法	29
実験結果	31
第1節 グルタミン酸神経毒性に対する NGF の保護作用	31
第2節 カルシウムイオノフォアおよびNOドナー誘発神経毒性に対する NGF の保護作用	35
第3節 TrkA の活性化に対する NGF の影響	38
第4節 p75 受容体による NGF 誘発神経保護への関与	41
考察	44

総括および結論 .....	47
謝辞 .....	49
発表論文目録 .....	50
参考論文目録 .....	51
引用文献 .....	52

# 緒 言

パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症などの難治性神経疾患は、特定の時期に特定の脳・脊髄部位の特定のニューロン群がニューロン死をおこすことによりニューロン数が著明に減少することに特徴がある。アルツハイマー病をはじめとする老人性痴呆症も大脳におけるニューロンの著しい脱落を伴うことから神経疾患としての側面をもっている。ニューロンは細胞分裂を行わないために、種々の要因により脳内の特定の部位のニューロンが脱落すると、残存するニューロンが突起を伸展し新たにシナプスを形成することにより低下した機能を補償すると推定される。しかし、神経疾患脳内のニューロンネットワークの代償能を上回る数のニューロン死が生じると、脱落したニューロン群が担っていた機能の低下あるいは破綻が生じるニューロン死により低下した機能を改善して疾患を治療することを目的とした薬物治療には、現在のところ補充療法を目的とした薬物が一般に用いられている。しかし、ニューロン死に伴う機能の低下は不可逆的であり、さらに進行性であることが多いため、補充療法は神経疾患の進行自体を阻止することは困難である。したがって、これらの神経疾患におけるニューロン死の機序を解析し、ニューロン死を制御する因子を解明することは、ニューロン死をターゲットとした神経疾患の予防・治療において重要な役割を果たすと考えられる。

脳虚血により誘発されるニューロン死の主要な危険因子としてのグルタミン酸の役割については非常に多くの研究が行われている。グルタミン酸は興奮性神経伝達物質として働くとともに興奮性神経毒としての側面を持つことはよく知られていることであるが、興奮性神経毒性に関わる因子として $\text{Ca}^{2+}$ と一酸化窒素 (NO) の2つの生体内物質が関与する。虚血時に脳内で過剰に遊離されたグルタミン酸はNMDA受容体を刺激することにより細胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇をもたらし、 $\text{Ca}^{2+}$ 依存性酵素の一つである神経型NO合成酵素 (nNOS) を活性化する。nNOSによって産生されたNOラジカル ( $\text{NO}\cdot$ ) は周囲の細胞に拡散し、細胞内で活性酸素と反応することにより一連のラジカル連鎖反応が生じ、細胞毒性を発現する。虚血性ニューロン死における「グルタミン酸- $\text{Ca}^{2+}$ -NO」仮説は主としてin vitro の培養細胞系での研究をもとに導かれたものであるが、in vivo の研究においても選択的nNOS阻害薬を用いた研究やnNOSノックアウトマウスでの研究により脳虚血により誘発されるニューロン死のメディエーターとしてのNOの重要性は示唆されている。

グルタミン酸神経毒性は虚血誘発ニューロン死だけでなく種々の神経疾患におけるニューロン死においても重要な役割を果たすことが示されてきている。アルツハイマー病との関連ではアミロイド $\beta$ 蛋白 ( $\text{A}\beta$ ) の神経毒性におけるグルタミン酸神経毒性の関与が指摘されている。培養大脳皮質ニューロンにおいて細胞を $\text{A}\beta$ で前処置することによりグルタミン酸神経毒性が増強されること、さらに、培養細胞株においてNOS阻害薬あるいはNMDA受容体遮断薬により $\text{A}\beta$ 神経毒性が減弱することが報告されてきた。

これらの知見は、アルツハイマー病脳におけるニューロンの脱落にグルタミン酸神経毒性が重要な危険因子として働くことを示唆するものである。このように、グルタミン酸は脳虚血により誘発されるニューロン死に関与するとともに、種々の神経変性疾患におけるニューロン死においてキー・ファクターとして働くと考えられる。グルタミン酸は中枢神経系に広汎に分布する主要な興奮性神経伝達物質であり、ほとんど全てのニューロンがグルタミン酸の影響を受けると推定されるので、グルタミン酸神経毒性を制御する内因性物質を明らかにすることは、ニューロン死をターゲットとした神経疾患治療薬の探索研究において重要な役割を果たすと考えられる。

そこで著者はグルタミン酸神経毒性の機序に関する実験および内因性の神経保護物質に関する実験を行い以下の新知見を得た。

1、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質ニューロンを用いグルタミン酸誘発ニューロン死におけるPLC- $\delta$ の発現の変化について検討した。その結果、グルタミン酸の処置により、抗PLC- $\delta$ 抗体の免疫染色性が増加した。また、NMDA受容体拮抗薬およびNOS阻害薬をグルタミン酸と同時に投与することにより、グルタミン酸により誘発されるPLC- $\delta$ の免疫染色性の増加は抑制された。以上の結果から、大脳皮質ニューロンにおいてNMDA受容体の活性化によるNO産生によりアルツハイマー病で見られるのと同様のPLC- $\delta$ の制御が導かれることが示唆された。

2、培養大脳皮質ニューロンにおけるBDNFのグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。その結果、BDNFがNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性に対する強力な保護作用を持ち、さらに、その神経保護作用がNO誘発神経毒性に対する抑制作用に基づくものであることを見出した。

3、培養大脳皮質ニューロンにおけるNGFのグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。その結果、NGFがBDNFと同様にNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性に対する強力な保護作用を持つこと、さらに、その神経保護作用がNO誘発神経毒性に対する抑制作用に基づくものであることを示した。BDNFとNGFは同様の保護作用を発現するがその機序に関しては、BDNFが高親和性受容体であるTrkBを介するものであるのに対し、NGFは低親和性受容体であるp75を介するものであることを見出した。

これらの研究成果について以下に3章に分けて論述する。

なお、本文中で用いた略語は以下の通りである。

(略号)

A $\beta$ :	amyloid $\beta$ -protein
BDNF:	brain derived neurotrophic factor
BSA:	bovine serum albumin
DAB:	3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride
DAGK:	diacylglycerol kinase
GFAP:	glial fibrillary acidic protein
MAP2 :	microtubule associated protein 2
MAPK:	mitogen activated protein kinase
MEM:	minimum essential medium
MK-801:	dizocilpine((5R,10S)-(+)-5-methyl-10,11-dihydro-5H-dibenzo[a,d] cyclo-henten-5,10-imine)
NF- $\kappa$ B:	nuclear factor $\kappa$ B
NGF:	nerve growth factor
NMDA:	<i>N</i> -methyl-D-aspartate
NO:	nitric oxide
NOS:	nitric oxide synthase
NTR:	neurotrophin receptor
PBS:	phosphate buffered saline
PI3K:	phosphatidylinositol-3-kinase
PIP <sub>2</sub> :	phosphatidylinositol-4,5-biphosphate
PKC:	protein kinase C
PLC- $\gamma$ :	phospholipase C- $\gamma$
PLC- $\delta$ :	phospholipase C- $\delta$
RT-PCR:	reverse transcription-polymerase chain reaction
SHC:	Src homologous and collagen
SIN-1:	3-morpholinocydononimine
SNOC:	<i>S</i> -nitrosocysteine
Trk:	tropomyosin receptor kinase



# 第1章

## グルタミン酸神経毒性とホスホリパーゼ C- $\delta$ の関連について

アルツハイマー病は記憶や認識機能が進行的に損傷する神経変性疾患である。アルツハイマー病の特徴としては、老人斑や神経原線維変化といった病理像とニューロン死があげられる[1]が、これらの病理学的な指標の発達に關与するキーとなるシグナルは同定されていない。

細胞外のシグナルは様々なセカンドメッセンジャーを介して細胞内に伝達される。ホスホイノシチド特異的ホスホリパーゼC (PLC) はホスホイノシチドを加水分解してジアシルグリセロールとイノシトールリン酸を生成する。この中でも特にジアシルグリセロールはプロテインキナーゼC (PKC) を活性化し、またイノシトール-1,4,5-3リン酸は細胞内カルシウム動員の細胞内メッセンジャーとして働く[2-6]。

今までにPLCのアイソザイムであるPLC- $\delta$ が神経原線維変化や老人斑中の損傷を受けた神経突起およびアルツハイマー病脳のニューロピルの繊維などに異常に集積していることが報告されている[7]。これらの知見はPLC- $\delta$ が神経変性疾患においてニューロン内の線維性の封入体の形成に關与していることを示唆している。興味深いことにPLC- $\delta$ はタウの免疫反応性のある同じニューロンに検出されており、このことは微小管結合蛋白であるタウとPLC- $\delta$ が密接に關与していることを示唆している[8, 9]。かくして、PLC- $\delta$ の蓄積は神経原線維変化の形成とニューロン死に深く關与した重要な細胞内の変化であるようだ。しかしながら神経原線維変化においてPLC- $\delta$ の免疫反応性が上昇する原因、その発現に關与する分子的機構、アルツハイマー病の様な神経変性疾患におけるこの酵素の役割は現在では知られていない。

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の神経毒性がいくつかの神経変性疾患のニューロン死に重要な役割を果たしていることが提唱されてきている[10]。培養細胞を用いた実験により短時間のグルタミン酸処置後、数時間後からニューロン死が引き起こされる[11]。この神経毒性はグルタミン酸受容体の一つであるNMDA受容体の競合的、非競合的の両方の拮抗薬で阻害されることが報告されている[12, 13]。したがって、グルタミン酸神経毒性にはNMDA受容体からのカルシウムの流入が重要な役割を果たしていると考えられている[14-16]。グルタミン酸がタウの免疫反応性を上昇させること[17]、およびグルタミン酸によるニューロン死およびタウの免疫反応性の上昇が細胞外のカルシウムの除去により抑制されたこと[17]から、グルタミン酸により誘発されるカルシウム流入がアルツハイマー病脳の神経原線維変化で觀察されるのと同様の蛋白の変化を引き起こすことを示唆している。

PLC- $\delta$ はアルツハイマー病脳でタウと密接に関与している[8, 9]ので、グルタミン酸誘発神経変性に関してin vitroで研究することはアルツハイマー病におけるこの酵素の関与する分子機構の解明に有用である。従ってPLC- $\delta$ の発現とグルタミン酸により誘発されるニューロン死との関係について培養大脳皮質ニューロンを用いて検討した。

## 実験方法

### (1) 初代培養大脳皮質ニューロンの調製と維持

妊娠ラット（妊娠 17-19 日目）をペントバルビタール（40-60 mg/kg ip）で麻酔し、37℃に加温した0.1%ヒビテン液に浸けて頭部を除く全身を消毒した。次いで、ラットを滅菌したバットの上に仰向けにして置き、腹部にイソジン塗布した。下腹部を切開し、腸管を傷つけないように注意して結合組織を切り離しながら子宮を引きずり出した。子宮を他の組織から切り離して取り出し、氷冷したハンクス液に浸けた。2回ハンクス液で洗浄した後、ハンクス液を満たした氷冷シャーレ上で胎仔を摘出した。摘出した胎仔は直ちに眼科剪刀で、断頭し、頭部は氷冷ハンクス液を満たしたシャーレに集めた。集めた頭部は氷冷ハンクス液で洗浄した後、ハンクス液の入ったコニカルチューブに移し、氷冷下に保存した。大脳の摘出はハンクス液を満たした氷冷シャーレ上で行った。ハンクス液が血液や組織で汚れてきたら適宜新しいシャーレに取り替えた。拡大ルーペ下、マイクロ剪刀と先鋭ピンセットを用いて頭蓋骨を除去した。次いで、ミクロスパーテルを用いて脳を頭蓋骨より取り出した。摘出した脳はハンクス液を満たした氷冷シャーレ上で保存した。実体顕微鏡下に、以下の手順で大脳皮質の切り出しを行った。脳幹を切り落とし、終脳の正中線にそって左右の大脳半球に分けた。間脳を切り離し、次いで、海馬を含む大脳辺縁系を切り落とした。最後に中心部に残った大脳基底核を大脳皮質から切り離した。大脳皮質に硬膜が付着している場合はピンセットを用いて全て取り除いた。部位分けの完了した大脳皮質はハンクス液を満たしたシャーレに集め氷冷下に保存した。

以下の操作はクリーンベンチ内で行った。大脳皮質をコニカルチューブに移し、摘出操作中に混入したバクテリア等を除去する目的で10 mlのハンクス液で10回洗浄した。大脳皮質をシャーレに移し、メスでできるだけ細かく細切した。細切した組織をハンクス液に懸濁し、メスピペットで十分にピペッティングを行った後、ステンレススチール・メッシュ（150 mesh）を通してコニカルチューブに集めた。細胞懸濁液を1,000 rpmで3分間遠心した後、上清を取り除き、ウシ胎仔血清添加Eagle液で再懸濁した。懸濁液の一部を取り分け、0.8%トリパンブルーにて染色後、顕微鏡下に生存細胞数を計数した。計数結果に基づき、最終細胞濃度が $1.7 \sim 2.0 \times 10^6$  cells/mlとなるように適量のウシ胎仔血清添加Eagle液を加えた。培地として用いるEagle液には、イーグルMEM培地（日水製薬）をベースとしたものを用いた。イーグルMEM培地原末 9.4 g ; NaHCO<sub>3</sub> 2.0 g ; L-

glutamine 0.29 g; glucose 1.0 g; HEPES 2.38 g を精製水（最終液量 1000 ml）に溶解したものを Eagle's MEM をして以下の実験に用いた。培地は濾過滅菌して用いた。

単離した細胞は培養ディッシュ底面に置いたプラスチック製カバースリップに接着させて培養した。すなわち、ポリエチレンイミンにてコーティングしたプラスチック製カバースリップ（50 mm<sup>2</sup>）を 25 枚程度敷いた細胞培養用ディッシュ（ファルコンディッシュ、60 mm）を用意しておき、上述の方法で得られた細胞懸濁液を細胞培養用ディッシュに 3 ml ずつプレーティングし、37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件にセットした CO<sub>2</sub> インキュベータにて、細胞を維持した。

培養初日から 8 日目までは 10% ウシ胎仔血清含有 Eagle 液を培地として用いた。培養を開始して 5～6 日程度でグリア細胞が観察されるようになったので、培養 6 日目から 2 日間にわたって cytosine arabinoside（10 μM）を投与することにより、グリア細胞などの増殖を抑制した。培養 8 日目に培地を 10% ウマ血清含有 Eagle 液に換えて培養を続けた。培養 10～14 日目の細胞を実験に用いた。

このようにして維持された培養大脳皮質細胞は、通常ニューロンを主体としたものになった。免疫染色によりニューロンとグリア系の細胞の割合を検討したところ、ニューロンのマーカーである抗 microtubule associated protein 2（MAP2）抗体で染色される細胞が 90% 以上を占めており、グリア細胞のマーカーである抗 glial fibrillary acidic protein（GFAP）抗体で染色される細胞は 1 % 以下であった。

## （2）グルタミン酸神経毒性の評価

グルタミン酸により誘発される神経細胞死は組織学的に検討した。すなわち、培養細胞をグルタミン酸含有 Eagle 液で 10 分間処置した後、グルタミン酸不含 Eagle 液中で 24 時間インキュベートを行った。その後、死亡細胞を選択的に染色する性質を持つ色素であるトリパンブルー（1.5%）を用いて 10 分間培養細胞を染色し、氷冷した 10% 中性等張ホルムアルデヒド液で細胞を固定し、更に生理的食塩水で洗浄後、ホフマン・モジュレーション・コントラストを装着した顕微鏡観察下に非染色細胞（生存細胞）と染色細胞（死亡細胞）を合計 200 個以上計数した。計数した総細胞数（生存細胞+死亡細胞）に対する生存細胞の百分率を求め培養細胞の生存率を求めた。コントロールあるいは薬物処置による細胞の平均生存率及び標準誤差を算出するために、それぞれの処置につき 5 枚のカバースリップを用いた。実験はすべて 37℃ の血清不含 Eagle 液中で行った。

## （3）培養細胞の免疫細胞化学

細胞を PBS で 3 回洗った後、4℃ の 4% パラホルムアルデヒドで 30 分間固定した。その後、細胞は再度 PBS で洗浄し、Triton X-100 で 30 分間インキュベートした後、3% 正常ヤギ血清で 1 時間処置した。その後、3% の BSA を含んだ PBS 中の抗 PLC-δ 一次抗体（1:2000）で一晩処置した。PBS で洗浄後、ビオチン標識された 2 次抗体でインキュベートした。PBS で洗浄後、アビジン・ビオチン標識複合体（Vectastatin ABC kit; Vector Labs,

Burlingame, CA) を反応させた。トリス緩衝液で洗浄後、DAB および過酸化水素を反応させて可視化した。

染色強度は Microcomputer Image Analysis System for Bioscience (Imaging Research, Inc., St. Catharines, Ontario, Canada) を用いてそれぞれのグループで200のニューロンを測定した。それぞれの結果は arbitrary units として表した。それぞれの実験において5-6カバースリップを用いて means  $\pm$  S.E.M. を得た。

#### (4) イムノブロット

培養細胞はテフロン-ガラスホモジナイザーを用いて9倍量のHEPESバッファー中でホモジナイズした。ホモジネートは105,000 $\times g$ で60分間遠心し、その上清を細胞質分画として用いた。沈殿は抽出バッファーに溶解し膜分画として用いた。10 mgのサンプルを用いて8-16%のポリアリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。ニトロセルロースに転写後、抗PLC- $\delta$ 一次抗体(1:5000)で4 $^{\circ}$ Cにおいて18時間インキュベートした。ブロットはその後0.1% Tween 20を含んだPBS (TPBS)で洗浄した後、ビオチン標識した抗ウサギIgG (Vector Labs) で1時間インキュベートし、TPBSで洗浄後、アビジン・ビオチン標識複合体 (Vectastatin ABC kit; Vector Labs, Burlingame, CA) を反応させた。トリス緩衝液で洗浄後、DAB および過酸化水素を反応させて可視化した。

#### (5) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

イーグル培地は Nissui Pharmaceutical Co. (Tokyo, Japan) から、MK-801 は Research Biochemicals International (Natick, USA) から、グルタミン酸ナトリウムは Nacalai Tesque (Kyoto, Japan) から、N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine および NMDA は Sigma (St. Louis, USA) から購入した。

また、PLC- $\delta$  に対する特異的な抗体は Escherichia coli expression system を用いて PLC- $\delta$  蛋白から調製した[18]。この抗体はヒトおよびラット PLC- $\delta$  を 85 kDa の蛋白として認識する[7]。

#### (6) データ処理

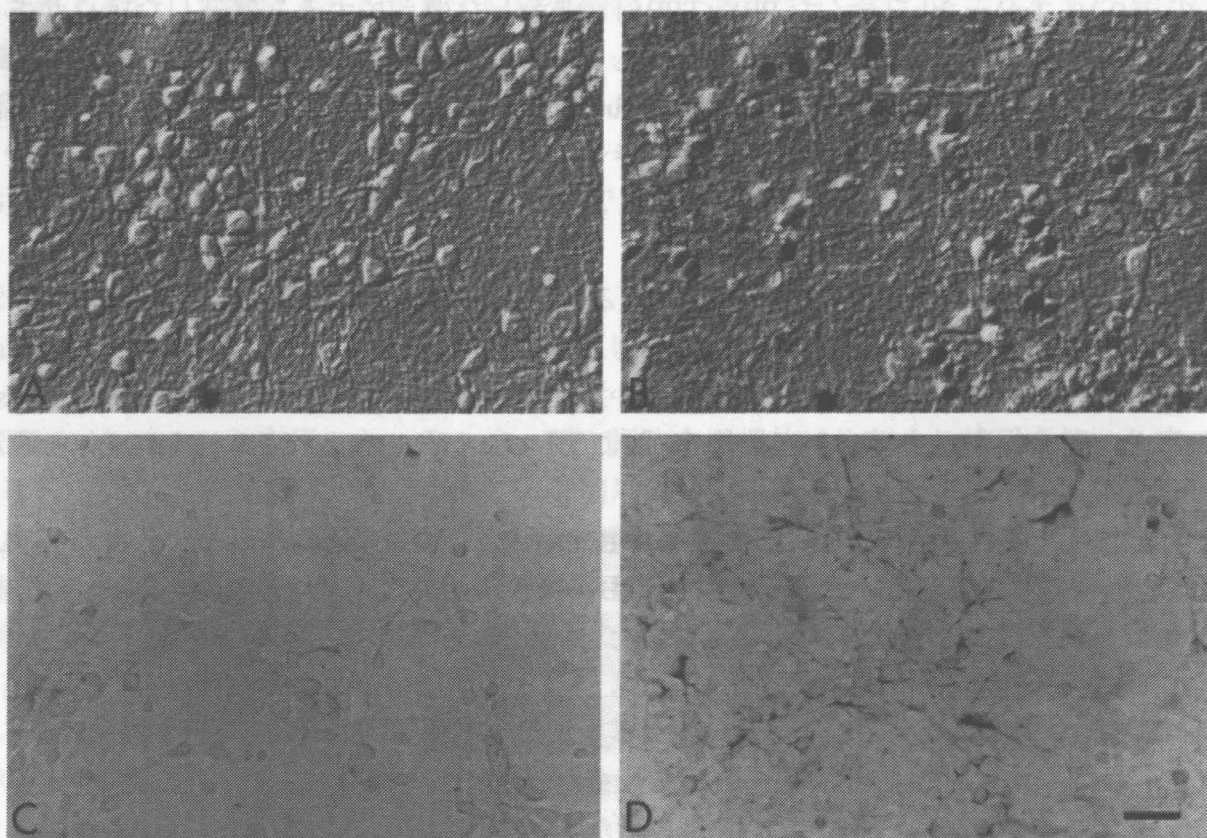
データは全て means  $\pm$  S.E.M. で表した。また、統計処理は Dunnett's two-tailed test を用い危険率5%未満のものを有意差ありとした。

## 実験結果

### 第1節 培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性の濃度依存性と機序

培養中に大部分の細胞が神経突起を伸ばし、ニューロン選択性の200 kDaの神経線維タンパクに対する抗体 (Labsystem, Helsinki, Finland) で染まり、抗glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体 (Dako Corp., Santa Barbara, CA) では染まらなかった。このことはGFAP陽性のアストログリアが我々の細胞系において存在していないことを示している。

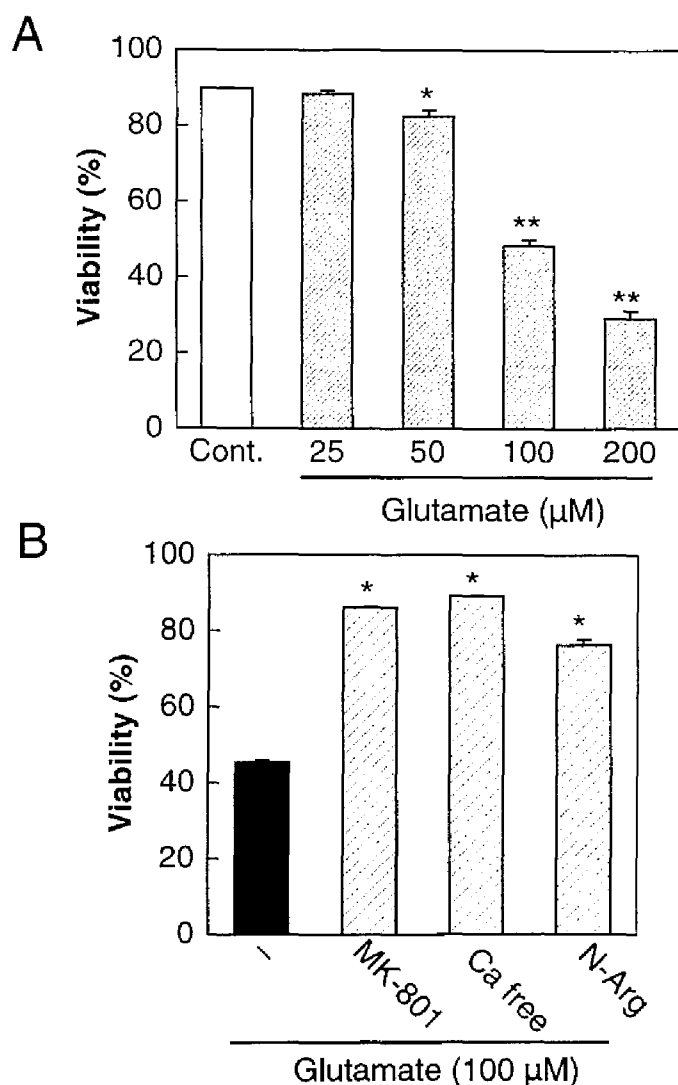
Fig. 1-1 および Fig. 1-2 にラット大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸の神経毒性を



**Fig.1-1 Glutamate-induced neurotoxicity and the effect of glutamate on PLC- $\delta$  immunoreactivity.**

Cultures were photographed after typan blue staining followed by formalin fixation (A, B) and immunostaining with an anti-PLC- $\delta$  antibody (C, D). A,C: Untreated cells (control). B,D: Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate, followed by incubation with glutamate-free medium. Bar = 50  $\mu$ m

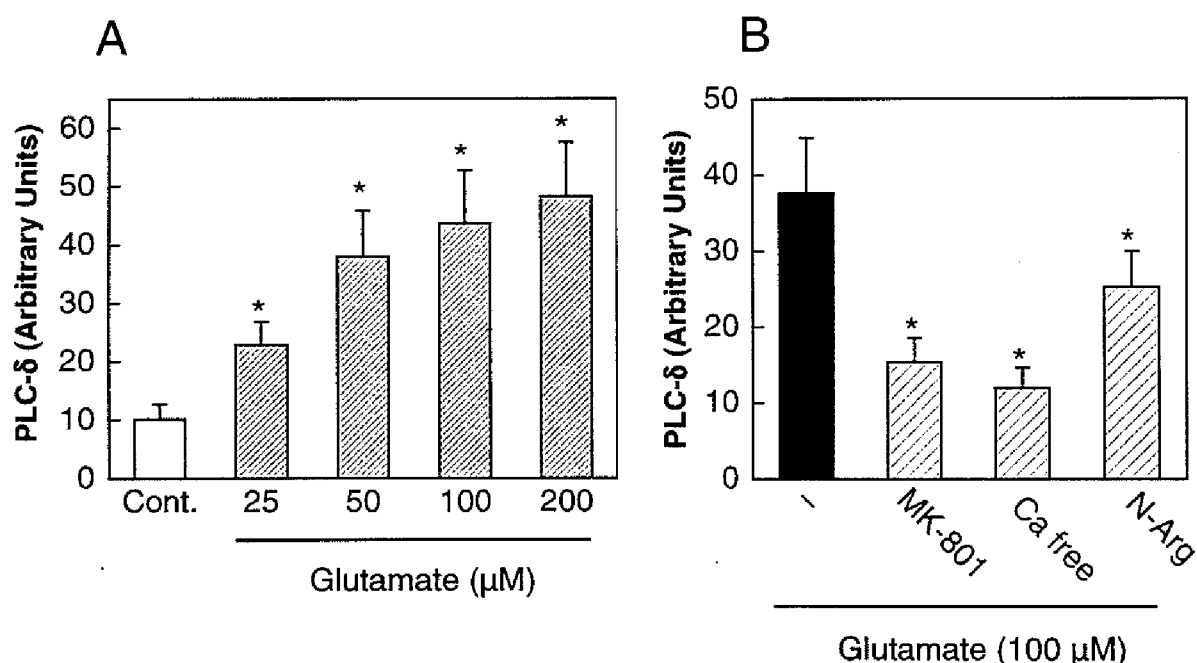
示した。100  $\mu\text{M}$ のグルタミン酸の投与によりトリパンブルーで染色されるニューロンの数が顕著に増加した (Fig. 1-1B)。定量的な結果を Fig. 1-2 に示した。細胞生存率はグルタミン酸の濃度が50  $\mu\text{M}$ 以上で有意に減少した (Fig. 1-2A)。NMDA 受容体の拮抗薬であるMK-801はグルタミン酸と同時処置することにより有意な保護作用を示した (Fig. 1-2B)。細胞外のカルシウムイオンがグルタミン酸神経毒性に重要であることを確かめるために、細胞外液からカルシウムイオンを除去した際の保護効果を検討した。細胞外液に



**Fig.1-2 Neurotoxicity induced by brief exposure to glutamate.**

Cultures were treated with glutamate for 10 min followed by incubation with glutamate-free medium for 24 hr. Results are given as the mean  $\pm$  SEM (n=5). A: Dose-response relationship of glutamate-induced neurotoxicity. \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$  vs. untreated cultures. B: The effects of application of MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) and application of  $N^w$ -nitro-L-arginine (N-Arg; 300  $\mu\text{M}$ ) or  $\text{Ca}^{2+}$  removal from the incubation medium (Ca free) on glutamate-induced neurotoxicity. MK-801 and N-Arg were added to the glutamate-containing solution. \* $P < 0.01$  vs. glutamate alone.

2 mM の  $\text{Ca}^{2+}$  が存在する場合には 100  $\mu\text{M}$  のグルタミン酸で 10 分間処置した後、24 時間インキュベートすることにより顕著な細胞死が観察されたが、細胞外液から  $\text{Ca}^{2+}$  を除去することによりほぼ完全にグルタミン酸神経毒性は抑制された (Fig. 1-2B)。加えて NO がグルタミン酸神経毒性に関与しているかどうかを明らかにするために、我々は NO 合成酵素の阻害薬である *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine のグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した。*N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (300  $\mu\text{M}$ ) は 100  $\mu\text{M}$  のグルタミン酸により誘発される細胞死を減弱した (Fig. 1-2B)。用いた全ての薬理的処置はそれぞれ単独の処置では細胞生存率には影響を及ぼさなかった。



**Fig. 1-3 Effects of a brief exposure to glutamate on PLC- $\delta$  immunoreactivity.**

Glutamate exposure was done by the same method as that described in Figure 1-2. Immunocytochemistry and the assessment of staining intensity were done as described in Methods. Results are given as the mean  $\pm$  SEM ( $n=5$ ). A: Dose-response relationship of the effect of glutamate on PLC- $\delta$  immunoreactivity. \* $P<0.01$  vs. untreated cultures. B: The effects of application of MK-801 (10  $\mu\text{M}$ ) and application of *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (N-Arg 300  $\mu\text{M}$ ) or  $\text{Ca}^{2+}$  removal from the incubation medium (Ca free) on glutamate-induced PLC- $\delta$  immunoreactivity. MK-801 and N-Arg were added to the glutamate-containing solution. \* $P<0.01$  vs. glutamate alone.

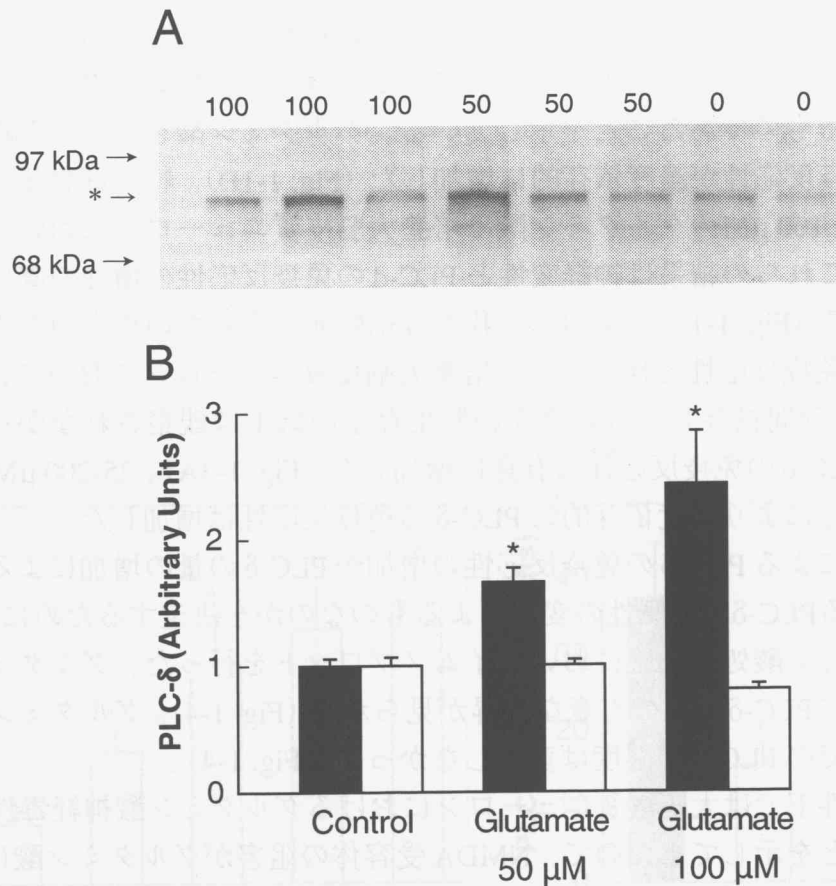
## 第2節 PLC- $\delta$ の免疫反応性に対するグルタミン酸の効果

Fig. 1-1、Fig. 1-3 および Fig. 1-4 に PLC- $\delta$  の免疫反応性に対するグルタミン酸の効果を示した。コントロールのニューロンでは PLC- $\delta$  の免疫反応性は低かった (Fig. 1-1C)。主に細胞体が染まり、軸索や突起はほとんど染まらなかった。グリア細胞は染色されず、免疫細胞化学のコントロールも陰性だった。このことはニューロンでの染色が一次抗体の特異的結合によるものであることを示している。グルタミン酸を投与した培養細胞において PLC- $\delta$  の免疫反応性が濃度依存的に増加した (Fig. 1-1D)。特に細胞体および突起が強く染色された。100  $\mu$ M のグルタミン酸は培養大脳皮質ニューロンにおいて細胞死の原因となるので、これらの結果は神経変性と PLC- $\delta$  の免疫反応性の増加の直接の関連を示唆するものである (Fig. 1-1)。それゆえ、我々は細胞死に至らない程度のグルタミン酸濃度での PLC- $\delta$  の免疫反応性を検討した。培養大脳皮質ニューロンにおいて、25  $\mu$ M のグルタミン酸を 10 分間投与しても有意な細胞生存率の低下は観察されなかった (Fig. 1-2A)。しかし、PLC- $\delta$  の免疫反応性は有意に増加した (Fig. 1-3A)。25-200  $\mu$ M のグルタミン酸の短時間投与により濃度依存的に PLC- $\delta$  の免疫反応性は増加した。

グルタミン酸による PLC- $\delta$  の免疫反応性の増加が PLC- $\delta$  の量の増加によるものか、転写後の調節による PLC- $\delta$  の抗原性の変化によるものなのかを決定するために、コントロールおよびグルタミン酸処置細胞においてイムノブロットを行った。グルタミン酸投与により細胞質分画に PLC- $\delta$  濃度の有意な上昇が見られた (Fig. 1-4)。グルタミン酸処置した細胞でも膜分画での PLC- $\delta$  の濃度は変化しなかった (Fig. 1-4)。

我々の実験条件下では大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性は NMDA 受容体を介することを示してきたので、NMDA 受容体の阻害がグルタミン酸による PLC- $\delta$  の免疫反応性の上昇に影響を与えるかどうかを検討した。NMDA 受容体の拮抗薬である MK-801 は 100  $\mu$ M のグルタミン酸により誘発される PLC- $\delta$  の免疫反応性の増加を抑制した (Fig. 1-3B)。グルタミン酸毒性はカルシウムイオンの流入が関与しているので、我々はグルタミン酸による PLC- $\delta$  発現におけるカルシウムイオン依存性を検討した。カルシウムイオンを除去した培地でインキュベートした場合は PLC- $\delta$  の免疫反応性はやや減少する傾向にはあったがほとんど影響は受けなかった。細胞外液にカルシウムが存在しない状態でグルタミン酸を投与するとニューロン死も PLC- $\delta$  の免疫反応性の増加も観察されなかった (Fig. 1-3B)。グルタミン酸に誘発される PLC- $\delta$  の免疫反応性の増加は NO 合成酵素の阻害薬である *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine によっても阻害された (Fig. 1-3B)。用いた全ての薬理的処置はそれぞれ単独の処置では PLC- $\delta$  の免疫反応性には影響を及ぼさなかった。





**Fig.1-4 The amount of PLC-δ in the cytosolic and membrane fractions in control and glutamate-treated cultured cortical neurons.**

Rabbit anti-PLC-δ antibody was used to detect a 85 kDa protein in the cytosolic and mambrane fractions of control (non-treated) and glutamate (50 and 100 μM)- treated cultures. A: An example of the Western blot in the cytosolic fractions of control (0) and 50 μM glutamate (50)- and 100 μM glutamate (100)-treated clutres is shown. A 85 kDa protein band recognized by anti-PLC-δ antibody is shown (\*). B: The Western blot was quantified by scanning densitometry in the cytosolic and membrane fractions. The PLC-δ content in the cytosolic fraction (■) was significantly increased in the glutamate-treated group compared with the control (non-treated) group. The PLC-δ content in the membrane fraction (□) was not changed in control and glutamate-treated groups. Bars show the SEM of 4 separate experiments. \* $P < 0.01$  vs. controls.

## 考 察

短時間のグルタミン酸処置後の遅延性ニューロン死は主にNMDA受容体を介することを明らかにした。細胞外のカルシウムイオンの除去によりグルタミン酸神経毒性は抑制された。このことは細胞外カルシウムイオンの流入がこの神経毒性の重要な要因であることを示唆している。また、NO合成酵素の選択的な阻害薬である *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine がグルタミン酸神経毒性を抑制した。このことにより培養大脳皮質ニューロンにおいてNOがグルタミン酸神経毒性のメディエータであることを示唆している。これらの結果は以前の報告と一致している[14, 15, 19-21]。

アルツハイマー病においてPLC- $\delta$ の免疫染色性は神経原線維変化、老人斑中の損傷を受けた神経突起およびニューロピルの繊維に局在している[7]。抗PLC- $\delta$ 抗体で染色された神経原線維変化の数は抗タウ抗体で染色される数とほぼ同等であった[8, 9]。加えてPLC- $\delta$ とタウの免疫反応性が様々な神経疾患におけるいくつかの線維性神経封入体で共存しているという知見[22]は、イノシトールリン脂質特異的シグナル伝達と細胞骨格構成物が密接に関係していることを示しているのかもしれない。PLC- $\delta$ の異常な集積はこれらの封入体の形成やそれらの出現への共通の代謝反応のもとになる共通の代謝異常であることを示唆している。

年齢の相応している痴呆でない正常脳では神経原線維変化は多くは見られないが、拡散性もしくは不定形な沈着は見られ、それらは抗PLC- $\delta$ 抗体に陽性であった[7, 23]。これらの沈着は神経原線維変化が見られる前のアルツハイマー病脳の最も早い検出可能な変化に似ているのかもしれない。繊維状の沈着が集積する前の拡散性もしくは不定形な沈着の発見は、PLC- $\delta$ の蓄積が神経原線維変化の形成に寄与する重要な細胞内変化であることを示しているのかもしれない。異常なPLC- $\delta$ の蓄積のメカニズムを明らかにすることは神経原線維変化の形成を抑制する方法の開発に重要であるかもしれない。

グルタミン酸は培養大脳皮質ニューロンにおいて細胞死の原因となり、PLC- $\delta$ の免疫反応性の上昇を引き起こした。非致死性の濃度のグルタミン酸では濃度依存的にPLC- $\delta$ の免疫反応性は上昇した。コントロールおよびグルタミン酸処置細胞でのイムノブロット分析によりグルタミン酸によるPLC- $\delta$ の免疫反応性の上昇は細胞質画分のPLC- $\delta$ の量の上昇によるものであり、既に存在しているPLC- $\delta$ の免疫反応性の変化によるものではないことが明らかになった。膜分画から細胞質分画へのPLC- $\delta$ の局在移行がグルタミン酸処置後に見られなかったが、グルタミン酸が突起から細胞体へPLC- $\delta$ を再分布させ、細胞質の免疫染色性を増加させたのかもしれない。というのも半定量的なPLC- $\delta$ の免疫反応性はニューロンの細胞質での測定に基づいているからである。グルタミン酸誘発ニューロン死とPLC- $\delta$ の免疫染色性の増加は両方とも細胞外カルシウムイオンの除去とNMDA受容体拮抗薬であるMK-801の添加によって抑制された。グルタミン酸誘発PLC- $\delta$ の免疫染色性の増加はNO合成酵素阻害薬である *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine によっても抑制された。これらの結果はNMDA受容体の活性化に引き続くカルシウムイオンの流入によって引き起

こされる NO 産生により PLC- $\delta$  の免疫染色性が増加することを示唆している。

グルタミン酸によるニューロンの変性の際に PLC- $\delta$  の免疫反応性が上昇するメカニズムについてはいくつか考えられる。PLC- $\delta$  は PIP<sub>2</sub> およびスフィンゴリエリンに対して高い結合特異性を示す。生理的条件下では、PLC- $\delta$  のかなりの量が PIP<sub>2</sub> と結合して不活性体の状態もしくはスフィンゴリエリンと結合して阻害された状態で膜に結合している[24]。グルタミン酸はカルシウムとイノシトールリン脂質経路の両方を活性化することが報告されており[25]、PIP<sub>2</sub> もしくはスフィンゴリエリンの濃度の変化によって、PLC- $\delta$  の免疫反応性が変化しているもしくは PLC- $\delta$  の産生が増加しているのかもしれない。また、グルタミン酸刺激の結果としてプロテアーゼによる分解を減弱しているために、PLC- $\delta$  の蓄積が起こっているのかもしれない。アルツハイマー病脳の細胞質画分において PLC- $\delta$  の濃度が有意に上昇しており、また、膜分画においては変化していないことは非常に興味深い[23]。このことは今回の研究においてグルタミン酸処置した培養大脳皮質ニューロンにおいても同様のメカニズムが存在することを示唆している。PLC- $\delta$  の蓄積の正確なメカニズムを確定するには更なる検討が必要である。

これまでの培養大脳皮質ニューロンを用いた検討により、グルタミン酸受容体刺激によるカルシウムもしくはイノシトールリン脂質シグナル経路の過剰な活性化がアルツハイマー病をふくむ様々な疾患に関与している可能性が示唆される[26]。カルシウムによる神経変性効果はよく知られている[27]が、細胞骨格の損傷を導く経路はまだ知られていない。我々は少なくとも細胞骨格損傷の早期の段階で、ホスホイノシチド代謝が関与している可能性および PLC- $\delta$  の異常な蓄積が細胞骨格の損傷と細胞死の両方に重要な役割を果たしていることを示唆した。タウでみられるような細胞骨格の構成物の異常なリン酸化は異常に活性化した PLC によるプロテインキナーゼの活性化によるものであるかもしれない。この点に関しても酵素に関する更なる検討が必要である。

アミロイド  $\beta$  蛋白 ( $A\beta$ ) の前駆体の代謝がアルツハイマー病の病理に中心的な役割を持っていると認識されてきている[28]。 $A\beta$  やその断片が成熟していない、分化していないニューロンに対して栄養因子的な働きを持つことが示されている[29, 30]。これらの効果はニューロペプチドのタキキニンファミリーと相同性のある断片によって発現している[30]。 $A\beta$  のみでもタキキニン受容体を弱いながらも活性化するが、グルタミン酸の共存によりタキキニン受容体を完全に活性化し、ホスホイノシチド代謝回転とおそらく PKC の活性化も引き起こす[31]。栄養作用を発現するよりも高い濃度においては  $A\beta$  は培養成熟ニューロンに毒性を示す[30]。加えて  $A\beta$  とグルタミン酸は互いに細胞内カルシウムイオン濃度上昇および細胞死を増強する[32, 33]。ある程度の濃度のグルタミン酸の存在下、高濃度の  $A\beta$  もしくは通常濃度の  $A\beta$  による過刺激はアルツハイマー病において過剰なホスホイノシチドの代謝回転およびプロテインキナーゼの効果によるニューロンの損傷の原因になるかもしれない。したがって  $A\beta$  単独もしくはグルタミン酸の存在下における PLC- $\delta$  の免疫反応性への影響は更なる検討が必要である。

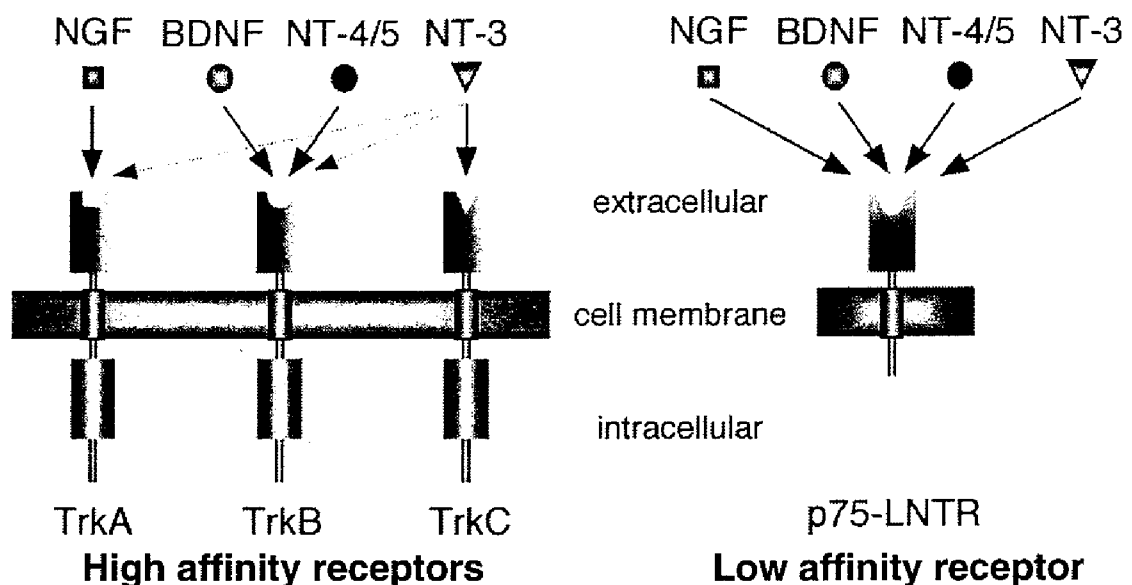
## 第2章

# 脳由来神経栄養因子 (BDNF) による グルタミン酸神経毒性の制御

ニューロトロフィンとは神経成長因子遺伝子ファミリーの総称であり、神経成長因子 (NGF)、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、ニューロトロフィン-3 (neurotrophin-3: NT-3) およびニューロトロフィン-4/5 (NT-4/5) が含まれる[34, 35]。NGFは交感神経細胞、神経冠由来知覚神経細胞などに作用し、その生存や機能維持、神経突起の伸長、神経伝達物質の合成を促進する。分子量は約26,000である。生体内で存在し作用するNGFはごく微量であり検出も困難である。しかし、マウス顎下腺などの外分泌組織に多量に存在しており、そこからの精製品により末梢神経系の形成過程を分子レベルで解明していく上で重要な役割を果たしてきた[36]。その後、知覚ニューロンの生存と突起伸展を促す神経栄養因子としてブタ脳より精製されていたBDNFは、1989年になってそのcDNA配列がクローニングされ、そのアミノ酸配列がNGFのアミノ酸配列と高い相同性を示すことが明らかとなった[37]。これをきっかけとして類似因子の探索が行われNT-3、NT-4、NT-5が発見された。これらの因子はNGFと構造が類似しており、それぞれ少しずつ異なる作用スペクトルでニューロンに作用する。

ニューロトロフィン・ファミリーの受容体 (NTR) については多くの研究者によって行われており[38, 39]、その結果、NGF作用の発現に必要な濃度に対応する高親和性NTRと、より高濃度を必要とする低親和性NTRの2種類が存在することが明らかとなった。

高親和性NTRは *trk* (tropomyosin receptor kinase) 遺伝子産物により構成され、1ヶ所の膜貫通領域と細胞内にチロシンキナーゼ領域をもち、インスリン受容体などを含むチロシンキナーゼ型受容体に属している。*trk* プロトオンコジーンは、結腸ガン由来のオンコジーン *trk* のカルボキシル基末端側のチロシンキナーゼドメインを含む領域に対応するプロトオンコジーンである。高親和性NTRの中ではNGF受容体である *TrkA* が最初に発見された[40]。活性化された *TrkA* はホモダイマーを形成すると考えられている。*TrkA* の発見に続いて、*TrkA* と高い相同性を有する *TrkB* と *TrkC* が相次いで発見された[41, 42]。*Trk* ファミリーは、そのチロシンキナーゼドメインにおいて相同性が最も高く、細胞内において類似したシグナル伝達経路を持つと考えられる。*Trk* ファミリーに対するニューロトロフィンファミリーの結合が調べられた結果、*TrkA* はNGF受容体として機能し、*TrkB* はBDNF、NT-4に対する受容体、*TrkC* はNT-3に対する受容体として働くことが推定されている (Fig. 2-1)。*Trk* ファミリーの発現はin situハイブリダイゼーション法を用いて組織レベルで調べられている[43]。*TrkA* の発現は、NGF応答性神経、すなわち、末梢では神経堤由来の神経細胞、後根神経節知覚神経、上頸部神経節交感神経、三叉神経の発達に伴って発現し、中枢では中隔に多く発現している。*TrkB*、*TrkC* は後根神経節や中枢神経系の広



**Fig. 2-1 Ligands for high affinity and low affinity neurotrophin receptors.**

い領域に発現している。なかでも、TrkBは脊髄・大脳皮質・手綱核・海馬・視床・小脳などにおける発現が高く、TrkCは海馬・大脳皮質・小脳における発現が高い。

低親和性NTR (p75-LNTR) は分子量75kDaの一本鎖構造を持ち、一次構造上、p75-LNTRは tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリーの一員である。p75-LNTRはBDNFやNT-3、NT-4/5に対する共通の低親和性受容体として機能することが確認されている。p75-LNTRは交感神経、知覚神経、前脳基底核のコリン作動性神経など、NGFに応答する細胞ほぼ全てに存在している。しかし、リガンドに対する選択性が乏しく、単独では高親和性受容体を形成することのないp75-LNTRのニューロンにおける役割には不明の点が多い。

Trkファミリーの発見により、ニューロトロフィンの細胞内シグナル伝達機構の解明が急速に進んでいる[44, 45]。NGFのTrk受容体の結合はTrk自身のチロシンリン酸化を引き起こすとともに、Trkに結合したホスホリパーゼC $\gamma$  (PLC $\gamma$ )、ホスファチジルイノシトール-3-キナーゼ (PI3K) やSHC (Src homologous and collagen) 蛋白を活性化する。PLC $\gamma$ 、PI3K、SHC蛋白などの活性化はGTPase活性化蛋白 (GAP) やRas調節因子を介してRasの活性化を引き起こす。Rasの活性化はさらにRaf-1、MAPキナーゼ、S6キナーゼ、ERKなど一連のセリン-スレオニンキナーゼを活性化する。これらのキナーゼの活性化の情報は、核へ伝えられ遺伝子発現を変化させると考えられるが、そのメカニズムはまだ不明である。

哺乳類の神経系はその生存をニューロトロフィンに広く依存している。中枢神経系において、BDNFおよび高親和性BDNF受容体であるTrkBのmRNAは、大脳皮質および海馬で最も多く発現しており[46, 47]、BDNFは大脳皮質のニューロンの生存を促進する[48]。さらに、脳虚血により誘発される神経細胞死に対してBDNFが保護作用を持つことが示唆されてきている[49]。

グルタミン酸は前述のように低酸素虚血脳障害のような神経系の疾患に広く関与している[10, 50]。培養大脳皮質ニューロンにおいて、グルタミン酸はNMDA受容体を刺激することにより細胞内へのカルシウム流入を引き起こし、それによりNOの産生を引き起こす。NOは近傍の細胞に拡散し、適切な生理反応とグルタミン酸の関与した細胞死を引き起こす[19, 51-53]。かくして、NOは大脳皮質においてNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性における重要なメディエータである。

しかしながら、NOが関与する神経細胞死におけるBDNFの役割についての研究はあまりなされていない。以前に著者らのグループによって、培養大脳皮質ニューロンにおいてBDNFの前処置によりグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を示したことを報告した[54]。同様の知見は他の研究者からも報告された[55, 56]。これらの研究とは対照的に、Kohらは最近、BDNF処置により血清除去により引き起こされるアポトーシスは減弱されるが、グルタミン酸神経毒性は増強されることを報告した[57]。そこで、著者は培養大脳皮質ニューロンを用いBDNFのグルタミン酸神経毒性に対する作用を明らかにする目的で研究を行った結果、BDNFがNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性に対する強力な保護作用を持つことを見出し、さらに、その神経保護作用がNO誘発神経毒性に対する抑制作用に基づくものであることを見出した。

## 実験方法

### (1) 初代培養大脳皮質ニューロンの調製と維持

第1章実験方法(1)に同じ。

### (2) グルタミン酸神経毒性の評価

第1章実験方法(2)に同じ。

### (3) TrkB のチロシンリン酸化の測定

培養ニューロンは37℃で示された時間、BDNFを処置された。インキュベーション後、培地は抜き取り、細胞はPBSで洗浄した。その後、細胞を氷冷下に集め、lysis buffer (1% NP-40、50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) で可溶化した。20,000  $\times g$  で10分間遠心した後、その上清をタンパク量 (150 mg protein/100  $\mu\text{l}$  lysis) で補正した。免疫沈降は、抗 TrkB モノクローナル抗体を 1:100 で添加し、4℃で4時間反応させ、その後 Protein G-Sepharose を添加し、さらに4℃で一晩反応させることにより行った。得られた免疫沈降物は、lysis buffer にて3回洗浄後、抗ホスホチロシン抗体 (Upstate Biotechnology, 1:1000 dilution) によるイムノブロット解析に供した。ホスホチロ

シンに免疫反応性を持つタンパクのバンドの強さはイメージスキャナでコンピュータに取り込んだ後、NIH image を用いて解析した。

#### (4) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

イーグル培地、MK-801、グルタミン酸ナトリウム、*N*<sup>w</sup>-nitro-L-arginine および NMDA は第 1 章と同じものを用いた。イオノマイシンは Calbiochem から、3-morpholinohydrononimine (SIN-1) は Dojindo から、亜硝酸ナトリウムは Nacalai Tesque から購入した。recombinant BDNF は human BDNF をコードした cDNA を含む recombinant バキュロウイルスをトランスフェクトした Sf21 細胞を用いて作製した。

S-ニトロソシステイン (SNOC) は Lei らの方法によって調整した[61]。すなわち、水に溶解した L-システインと亜硝酸ナトリウムを等量ずつ混合し、その溶液に最終濃度が 0.5 N となるように 10 N の塩酸を加えた。この溶液の濃度を SNOC として 100 mM とみなし計算した。SNOC 溶液は調整後、15 分以内に実験に用いた。室温で一晩放置した SNOC 溶液では細胞の生存率には影響しない。

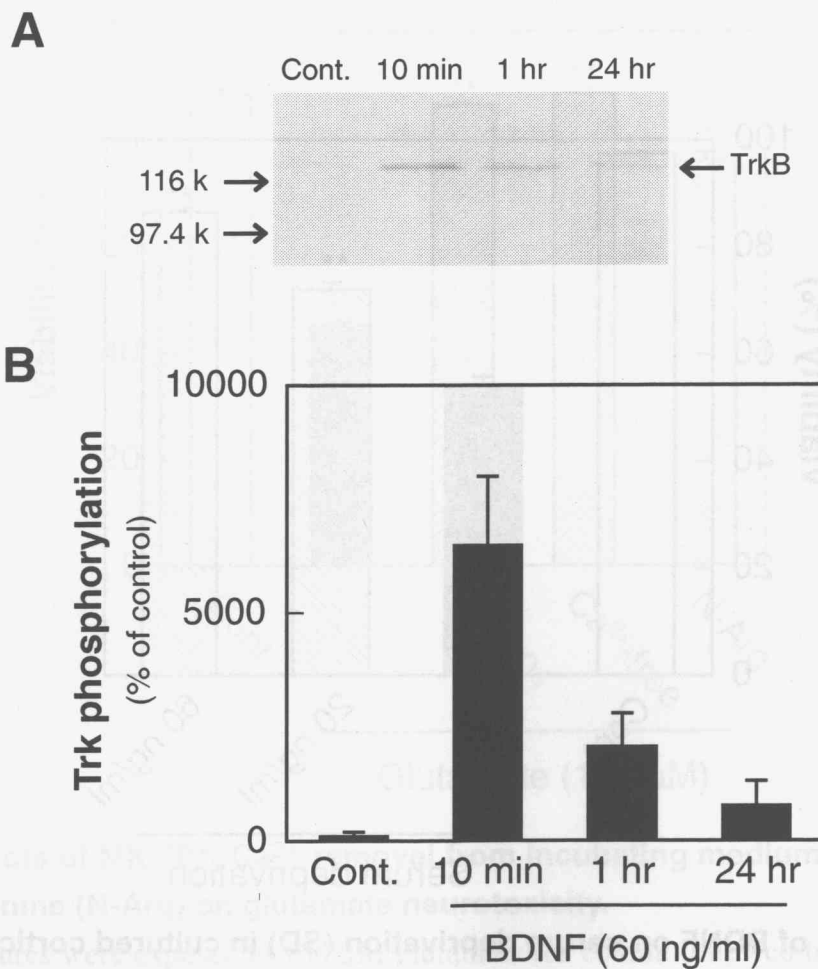
#### (5) データ処理

第 1 章実験方法 (6) に同じ。

## 実験結果

### 第1節 培養大脳皮質ニューロンにおける TrkB の活性化に対する BDNF の影響

BDNFが結合することにより TrkB の活性化は自己リン酸化を導き、特異的なシグナルを伝達する[58, 59]。ウエスタンブロッティングにより培養大脳皮質ニューロンにおける TrkB の発現および BDNF による活性化を検討したところ、通常の条件で培養したニュー

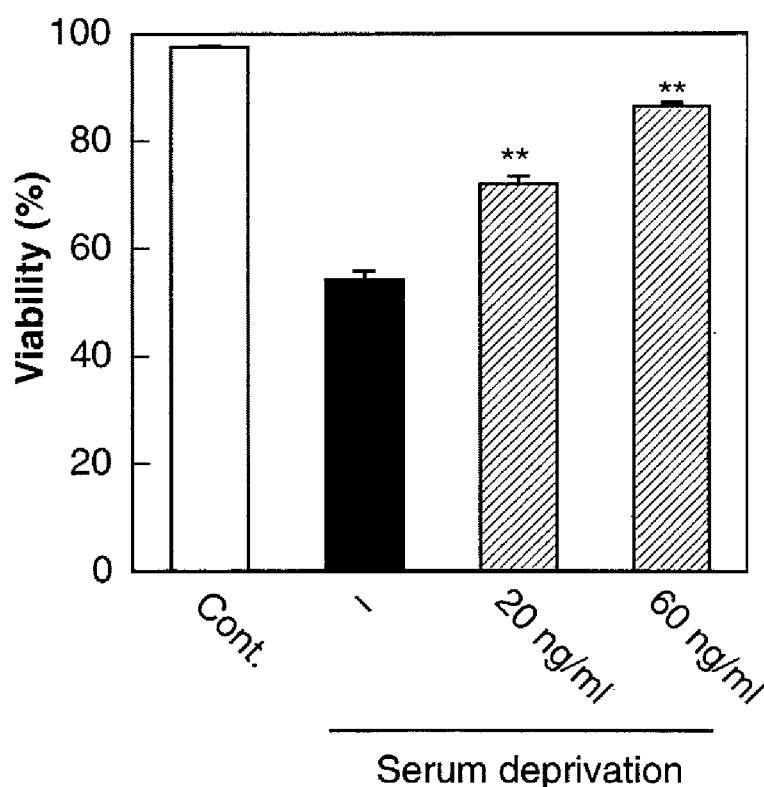


**Fig. 2-2 BDNF stimulates the tyrosine phosphorylation of TrkB in primary cortical cultures.**

Lysates were immunoprecipitated with anti-TrkB antibody and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE), followed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody (A). The Western blot was quantified by densitometry (B).



ロンにおいてTrkBが高発現していることが確認された。ついで、培養大脳皮質神経細胞を用いて、BDNF (60 ng/ml) の投与後10分から24時間の範囲でTrkBのチロシンリン酸化を測定したところ、TrkBのリン酸化は10分までに最大に達し、その後はBDNFの投与時間に依存して減少した (Fig. 2-2)。この結果により大脳皮質ニューロンにおいてTrkBが発現しており、BDNFの投与により活性化が引き起こされることが示された。最近の研究から培養大脳皮質ニューロンにおいて、BDNFがアポトーシスを抑制することが明らかにされてきている[57]。そこで、培養ニューロンにおけるアポトーシスのモデルとして用いられている血清除去に対するBDNFの効果を検討した。培養大脳皮質ニューロンを48時間の血清除去に曝すことによりアポトーシス様のニューロン死が誘発された (Fig. 2-3)。BDNF (20および60 ng/ml) を48時間血清除去中に添加することによりアポトーシス様のニューロン死は抑制された (Fig. 2-3)。

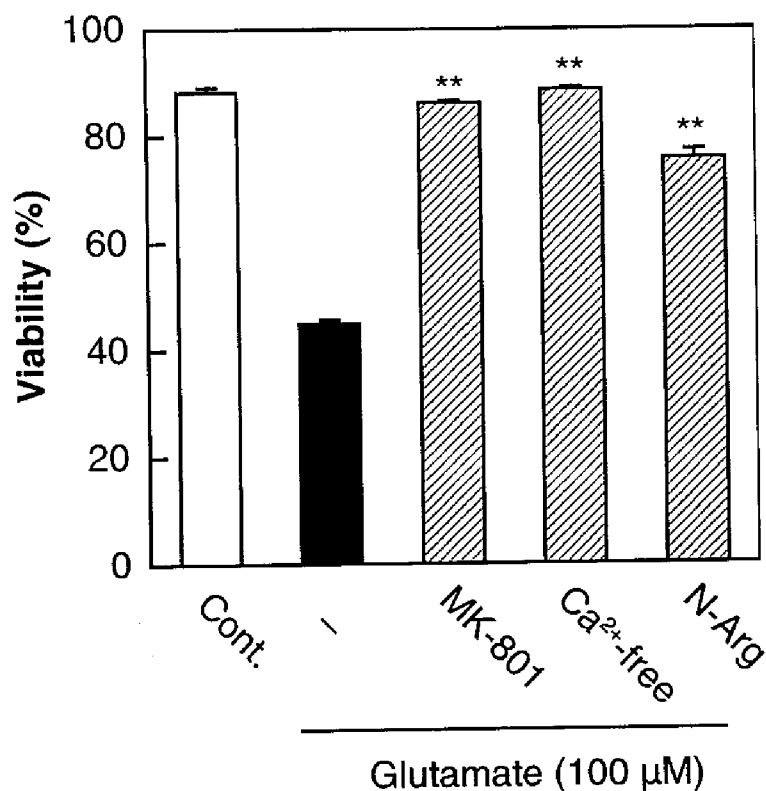


**Fig. 2-3 Effect of BDNF on serum deprivation (SD) in cultured cortical neurons.**

Cultures were incubated with serum-free medium for 48 hr. BDNF was added for 48 hr to serum-free medium. \*\* $P < 0.01$ , compared with SD alone.

## 第2節 グルタミン酸神経毒性の機序

グルタミン酸 (100  $\mu$ M) の短時間投与により遅延性細胞死が誘発された (Fig. 2-4)。グルタミン酸神経毒性は、NMDA 受容体拮抗薬の MK-801 (1  $\mu$ M) および NO 合成酵素阻害薬の *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (300  $\mu$ M) をグルタミン酸と同時投与することにより抑制された。さらに、グルタミン酸投与時に細胞外液中の  $\text{Ca}^{2+}$  を除去することによってもグルタミン酸神経毒性は抑制された。このことにより、以前の報告と一致して、NMDA 受容体を介するグルタミン酸神経毒性に NO が重要な役割を果たしていることが示された。

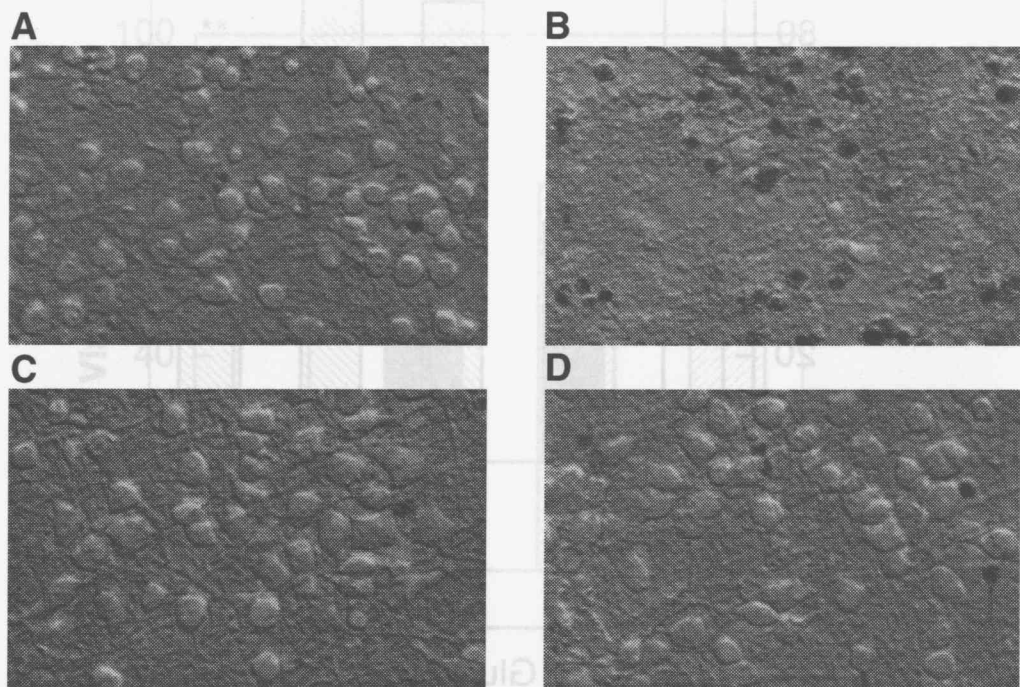


**Fig. 2-4 Effects of MK-801,  $\text{Ca}^{2+}$ -removal from incubating medium and *N*<sup>ω</sup>-nitro-L-arginine (N-Arg) on glutamate neurotoxicity.**

Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate for 10 min followed by 24-hr incubation with standard medium. MK-801 (1  $\mu$ M) and N-Arg (300  $\mu$ M) were added to the glutamate-containing medium. In  $\text{Ca}^{2+}$ -free,  $\text{Ca}^{2+}$  was removed from the glutamate-containing medium. \*\* $P < 0.01$ , compared with glutamate alone.

### 第3節 グルタミン酸神経毒性に対するBDNFの保護作用

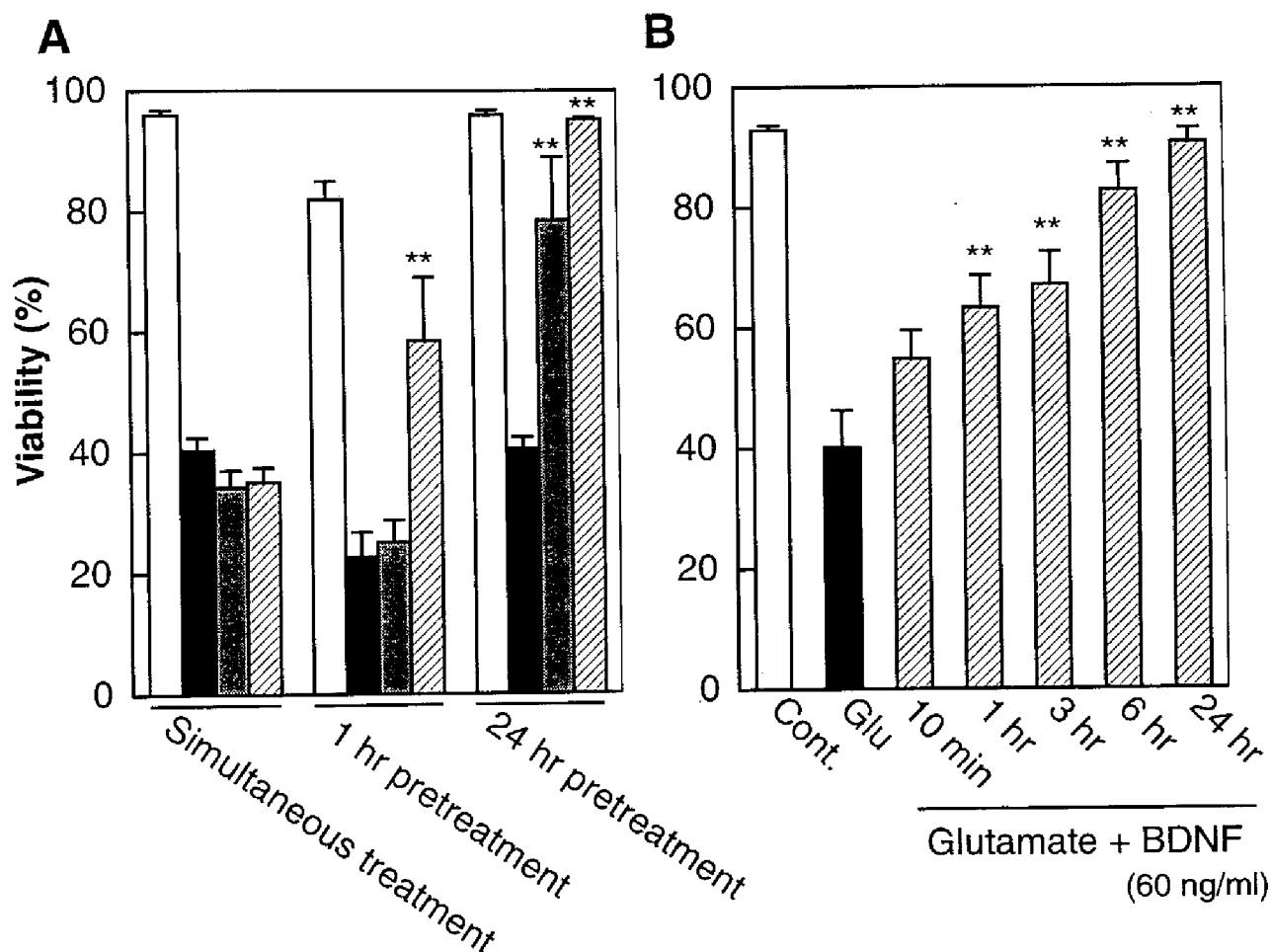
Fig. 2-5 にグルタミン酸神経毒性に対する BDNF (60 ng/ml) の保護作用の典型例を示した。コントロールとして用いた無処置細胞はトリパンブルーでほとんど染色されなかった (Fig. 2-5A)。グルタミン酸投与により細胞の形態が非常に変化するとともにほとんどの細胞がトリパンブルーで染色されたことから、神経細胞死が誘発されたことが確認された (Fig. 2-5B)。BDNF (60 ng/ml、24 時間) 投与は細胞の形態および生存率に影響を及ぼさなかった (Fig. 2-5C)。BDNF 前処置した細胞にグルタミン酸を投与したところ、グルタミン酸神経毒性はほぼ完全に抑制された (Fig. 2-5D)。BDNF (20 および 60 ng/ml) は、1 時間および 24 時間の前処置により、濃度依存的にグルタミン酸神経毒性を抑制した (Fig. 2-6A)。一方、グルタミン酸との同時投与では、BDNF は保護作用を示さなかった。さらに、10 分から 24 時間の範囲で投与時間を変えて検討したところ、BDNF は投与時間



**Fig. 2-5 Hoffman modulation photomicrographs showing BDNF-induced protection against glutamate neurotoxicity.**

Culture fields were photographed after Trypan blue staining followed by formalin fixation. A, B and C show non-treated, 100  $\mu$ M glutamate-treated and 100  $\mu$ M glutamate- plus BDNF-treated cultures, respectively. Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate for 10 min followed by 24-hr incubation with standard medium. In C, the culture was pretreated with 60 ng/ml BDNF for 24 hr prior to glutamate application. Calibration bar = 50  $\mu$ m.

に依存してグルタミン酸神経毒性を抑制した (Fig. 2-6B)。1時間の前投与でも有意な保護作用が観察されたが、グルタミン酸神経毒性を完全に阻害するには24時間の前投与が必要であった。

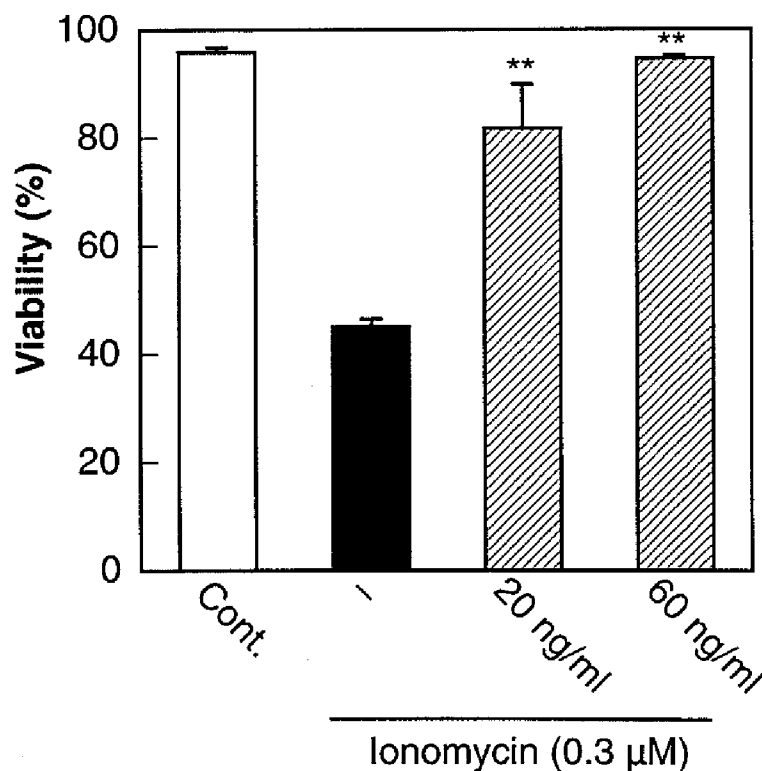


**Fig. 2-6 Protective effect of BDNF against glutamate neurotoxicity in cultured cortical neurons.**

A, BDNF prevented glutamate neurotoxicity in concentration-dependent and time-dependent manners. Open column: control. Filled column: glutamate (100  $\mu$ M) alone. Dotted column: glutamate plus 20 ng/ml BDNF. Hatched column: glutamate plus 60 ng/ml BDNF. BDNF was added to the glutamate-containing medium without pretreatment (simultaneous pretreatment) or added to pre-incubation medium prior to glutamate exposure (1-hr and 24-hr pretreatments). During pretreatment, BDNF was not added to the glutamate-containing medium. B, BDNF prevented glutamate neurotoxicity in time-dependent manners. Cultures were exposed to 60 ng/ml BDNF for 10 min-24 hr prior to glutamate (Glu) exposure. \*\* $P < 0.01$ , compared with glutamate alone.

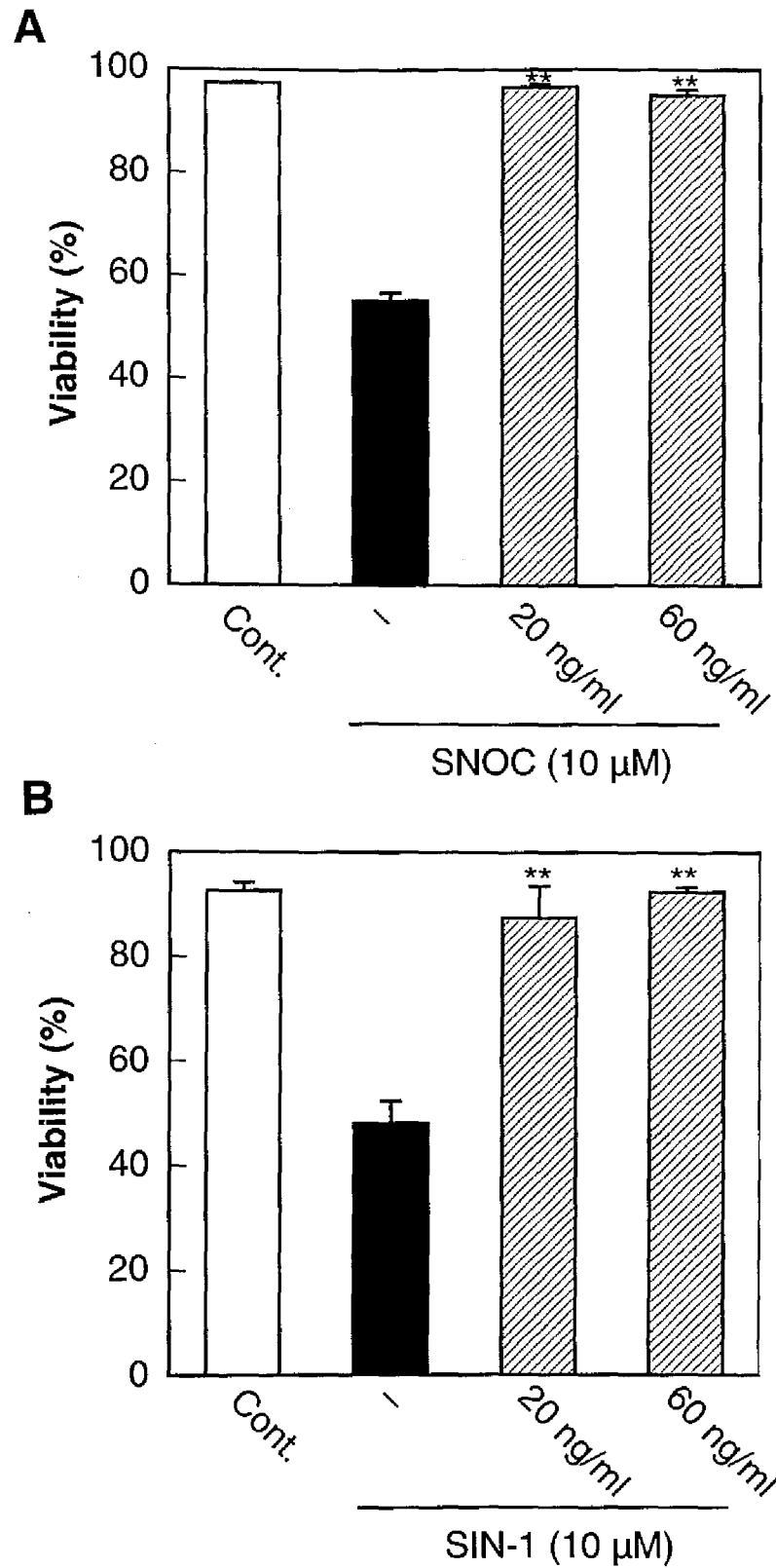
#### 第4節 カルシウムイオノフォアおよびNOドナー誘発神経毒性に対するBDNFの保護作用

BDNFの保護作用機序を調べる目的で、カルシウムイオノフォアのイオノマイシン、NOドナーのSNOCおよびNOと活性酸素を同時に生成するSIN-1の毒性に対する効果を検討した。典型的なカルシウムイオノフォアであるイオノマイシンは、グルタミン酸と同様のニューロン死を引き起こす (Fig. 2-7) [51, 60]。イオノマイシン誘発ニューロン死は細胞外カルシウム除去およびN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginineの投与により抑制されるが、NMDA受容体の阻害薬では影響を受けない。このことはイオノマイシンが直接細胞外からのカルシウム流入を引き起こし、NOの産生促進していることを示している。BDNF (20および60 ng/ml) は、24時間の前処置によりイオノマイシン誘発神経毒性を抑制した (Fig. 2-7)。NOドナーとしてS-ニトロソシステイン (SNOC) とSIN-1を用いた[61, 62]。SNOCおよびNOと活性酸素を同時に生成するSIN-1の短時間投与により細胞死が誘発された (Fig. 2-8)。BDNFを24時間前処置することによりSNOCおよびSIN-1誘発神経毒性は抑制された。



**Fig. 2-7 BDNF prevented neurotoxicity induced by ionomycin.**

Cultures were exposed to ionomycin for 10 min followed by a 24 hr incubation with normal medium. BDNF was added for 24 hr prior to application of ionomycin. \*\* $P < 0.01$ , compared with ionomycin alone.



**Fig. 2-8 BDNF prevented neurotoxicity induced by SNOc(A) and SIN-1(B).**

Cultures were exposed to SNOc (A) or SIN-1 (B) for 10 min followed by a 24 hr incubation with normal medium. BDNF was added for 24 hr prior to application of neurotoxins.

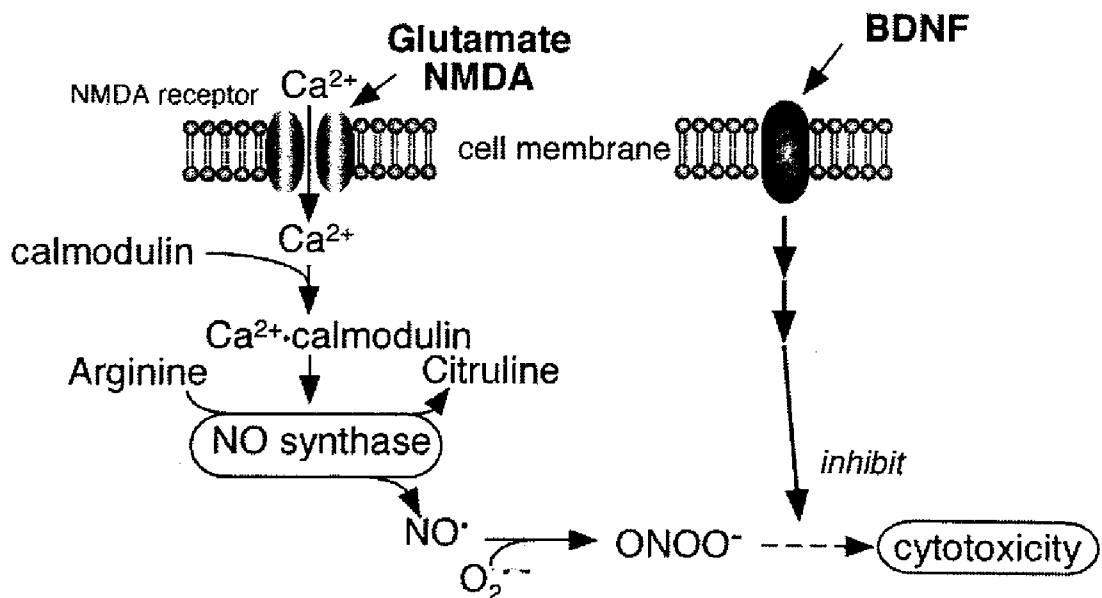
\*\* $P < 0.01$ , compared with neurotoxin alone.

## 考 察

BDNFの生物学的な作用がTrkBを介して発現しているという報告がなされてきている[43]。本研究ではラット胎仔由来の大脳皮質ニューロンがTrkBタンパクを発現しており、それを介してBDNFがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現していることを明らかにした。BDNFはグルタミン酸投与の前に処置することによりグルタミン酸神経毒性に保護作用を示した。この作用はBDNFの投与時間を減少させることにより消失した。

本研究において、培養大脳皮質神経細胞を用いて、BDNFの処置後のTrkBのチロシンリン酸化を測定したところ、TrkBのリン酸化は10分までに最大に達し、その後はBDNFの投与時間に依存して減少した。さらに、血清除去により誘発されるアポトーシス様の神経細胞死もBDNFを投与することにより抑制された。これらの結果は、ラット胎仔由来培養大脳皮質細胞系においてBDNFの高親和性受容体であるTrkBが発現しており、その生存維持機能が正常に働いていることを示すものである。

培養大脳皮質神経細胞において、短時間のグルタミン酸投与により遅延性神経細胞死が誘発された。グルタミン酸神経毒性は、NMDA受容体拮抗薬のMK-801、NO合成酵素阻害薬のN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginineの投与により抑制された。また、グルタミン酸投与時に細胞外Ca<sup>2+</sup>を除去した場合もグルタミン酸神経毒性は抑制された。これらの結果は、当研究室のこれまでの報告と一致するものであり、短時間のグルタミン酸投与によりNMDA受



**Fig. 2-9 Schematic representation of presumed mechanisms of the protective effect of BDNF against glutamate cytotoxicity mediated by NMDA receptors.**

容体を介して誘発される遅延性神経細胞死がNOをメディエーターとして発現していることを示唆する[20]。

培養大脳皮質神経細胞において、NMDA受容体性グルタミン酸神経毒性はFig. 2-9に示すようなカスケードによって発現すると考えられている。このカスケードにおいて、BDNFがどの段階に作用してグルタミン酸神経毒性に保護作用を発現するのかを検討した。その結果、BDNFはグルタミン酸神経毒性を抑制するだけでなく、カルシウムイオンフォアおよびNOドナーの神経毒性も抑制した。NOは活性酸素と反応してONOO<sup>-</sup>となり神経細胞死を惹起する[62]が、BDNFはONOO<sup>-</sup>を直接生成するSIN-1の神経毒性も抑制した。ChengらはBDNFおよびほかのニューロトロフィンがカルシウムホメオスタシスを安定化させることにより興奮毒性からニューロンを保護することを報告した[55]。さらに、成長因子がニューロンのフリーラジカルに対する防御機構を強めることを示唆する報告もなされている[55, 63, 64]。したがって、これらの研究と本研究を考えあわせるとBDNFはNOの関与するラジカルの毒性に対する神経細胞の抵抗性を増強することにより保護作用を発現すると考えられる (Fig. 2-9)。

培養大脳皮質神経細胞におけるBDNFの神経保護作用のメカニズムは不明であるが、保護作用の発現には、BDNF処置後にある程度の時間が必要なことから、何らかの細胞内機能分子の合成もしくは生理活性物質の遊離の促進が関与しているのかもしれない。この点に関しては次章にて検討した。



# 第3章

## 神経成長因子（NGF）による グルタミン酸神経毒性の制御

NGFとBDNFはニューロトロフィンファミリーの一員であり中枢神経系および末梢神経の生存や分化に関与している。それぞれのニューロトロフィンは低親和性受容体であるp75と高親和性の特異的なTrk受容体と相互作用する[38]。ニューロトロフィンはTrkファミリーとp75と結合した後、それぞれ異なった作用を及ぼし、Trkファミリーは細胞の生存に、またp75が細胞死に関連することを示唆するデータが蓄積されてきている。

NGFの高親和性受容体であるtrkA mRNAの発現は末梢神経系では感覚神経、交感神経に、中枢神経系では前脳基底核に局限して発現しており、中枢神経系に広範に分布しているtrkB、trkC mRNAとは異なっている[43]。一方、低親和性受容体のp75は脳皮質を含む中枢神経系に広範に分布している[65]。このことはニューロトロフィンの作用をp75が担っていることを示唆するものである。実際、最近の研究ではp75がTrk受容体とは独立して情報を伝達しNGFによるスフィンゴミエリンサイクルの活性化を引き起こすことが示されてきている[66]。

p75はNGFと結合することにより細胞生存を導くというよりもむしろ細胞死を引き起こすという報告がされた。たとえば発生初期段階における網膜ニューロンではTrkAが発現しておらずp75のみが発現している場合にはNGFは細胞死の原因になると報告されている[67]。また、ラット新生仔脳皮質から調製したオリゴデンドロサイトの細胞死にはNGFとp75との相互作用が関与しているという報告もある[68]。これらの知見はtrkAが発現していない細胞においてはNGFがp75を介して細胞死誘発因子として働くことを示唆するものである。

しかしながら、我々および他のグループでもNGFはtrkA mRNAが発現していない脳皮質の細胞でグルタミン酸誘発神経細胞死を抑制することが示されてきている[43,69,70]。これらの結果はNGFの作用のうち神経毒性よりもむしろ神経保護作用にp75が関与していることを示唆するものである。NGFが神経保護作用を発現することを示している研究者もいる。たとえば、カルシウムの関与する低血糖損傷に対して培養海馬および脳皮質ニューロンがNGFによって保護されるという報告[71,72]や前脳基底核のコリン作動性ニューロンの外傷誘発細胞死もNGFによって保護されるという報告もある[73]。これらの証拠は中枢神経系のニューロンに対して生存促進因子としてNGFが働くことを示唆するものであるが、NGFの保護作用メカニズムに関してはあまり知られていない。

今回の研究の目的は初代培養脳皮質ニューロンにおけるNGFの神経保護作用のメカ

ニズムを明らかにすること、および、BDNF との比較である。ここで、NGF がグルタミン酸誘発神経毒性を p75 受容体と相互作用することにより抑制したこと、さらに、BDNF は高親和性受容体である TrkB を介して保護作用を示したことを明らかにした。

## 実験方法

### (1) 初代培養大脳皮質ニューロンの調製と維持

第 1 章実験方法 (1) に同じ。

### (2) グルタミン酸神経毒性の評価

第 1 章実験方法 (2) に同じ。

### (3) Trk のチロシンリン酸化の測定

第 2 章実験方法 (3) に同じ。

### (4) MAPK のリン酸化の測定

培養ニューロンは 37℃ で示された時間、BDNF もしくは NGF を処置された。インキュベーション後、培地は抜き取り、細胞は PBS で洗浄した。その後、細胞を氷冷下に集め、lysis buffer (1% NP-40、50 mM Tris (pH 7.4)、150 mM NaCl、1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ 、2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin、1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)) で可溶化した。20,000  $\times g$  で 10 分間遠心した後、抗 phosphoMAPK 抗体 (New England Biolabs, 1:1000 dilution) によるイムノブロット解析に供した。phosphoMAPK に免疫反応性を持つタンパクのバンドの強さはイメージスキャナでコンピュータに取り込んだ後、NIH image を用いて解析した。

### (5) RT-PCR

Total RNA は Isogen (Nippon Gene Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いて常法により抽出した。抽出した total RNA のうち 2  $\mu\text{g}$  を含んだ反応溶液中に Superscript II (Life Technologies) を添加し逆転写反応を行うことにより cDNA を調製した。得られた逆転写産物のうち 1 ml を用いて trkA、trkB および p75 に対する特異的なプライマーで、Taq DNA polymerase (Perkin-Elmer, Branchburg, USA) を用いて増幅した。用いたプライマー配列は以下の通りである。trkA (359 b.p.) :5'-CGTGGAACAGCATCACTG-3' (センス鎖)、5'-CTTGATGTGCTGTTAGTGTC-3' (アンチセンス鎖)。trkB (945 b.p.) :5'-ATGTCGCCCTGGCCGAGGTG-3' (センス鎖)、5'-GAAGTGCTGGCTTGGGGTTG-3' (アンチセンス鎖)。p75 (663 b.p.) :5'-GAGGGCACATACTCAGACGAAGCC-3' (センス鎖)、

5'-GTCTATATGTTTCAGGCTGGTAACC-3' (アンチセンス鎖)。PCRは以下の反応条件で行った。preincubation、94℃、1分; denaturation、94℃、30秒; annealing、60℃、45秒; extension、72℃、1分30秒; 30サイクル。PCR産物は、エチジウムブロマイド含有3% アガロースⅡゲルで電気泳動した。

#### (6) セラミド量の測定

セラミド量の測定の前に細胞をニューロトロフィンで処置した後、PBSで2回洗浄した。培養細胞を氷冷下に集め、chloroform:methanol=1:2 (v/v) で脂質を抽出し、セラミドの含まれるchloroform層を測定に用いた。diacylglycerol kinaseおよび $[^{32}\text{P}]$ - $\gamma$ -ATPを加え、25℃、30分間反応させた。反応は $\text{HClO}_4$ を用いて停止した。反応物から脂質は上述の通り抽出し、 $\text{N}_2$ 下乾燥し、chloroform:methanol=95:5 (v/v) に溶解して薄層クロマトグラフィーにより分離した。展開相にはchloroform:methanol:acetic acid=65:15:5 (v/v)を用いた。元のサンプルに存在したセラミド量はサンプルの体積とATPの放射活性から計算した。オートラジオグラフィーによりスポットを可視化し、セラミド $[^{32}\text{P}]$ -1-リン酸に相当するスポットを掻きとり、液体シンチレーションカウンターにより放射活性を測定した。DAGKアッセイに関して、Wattsらはこのアッセイの信頼性がないかもしれないと報告した[74]。その報告の中では、内部標準として用いたC2:0セラミドのリン酸化の増加がみられ刺激後に減少したが、本研究においては内部標準のリン酸化の増加は観察されなかった。したがって、本研究におけるDAGKアッセイによってみられたセラミドのリン酸化の増加は基質であるセラミドの濃度の変化を反映していると考えた。

#### (7) 試薬

本研究で用いた試薬は以下の通りである。

イーグル培地、MK-801、グルタミン酸ナトリウム、 $\text{N}^\omega$ -nitro-L-arginine、NMDA、イオノマイシン、SIN-1、亜硝酸ナトリウム、BDNFおよびSNOCは第1、2章と同じものを用いた。CycloheximideはWakoから、anti-p75 antibody (anti-nerve growth factor-receptor, rat, Cat. No. 1198645, MC192)はBoehringer Mannheimから購入した。recombinant NGFはhuman NGFをコードしたcDNAを含むrecombinant バキュロウイルスをトランスフェクトしたSf21細胞を用いて作製した。

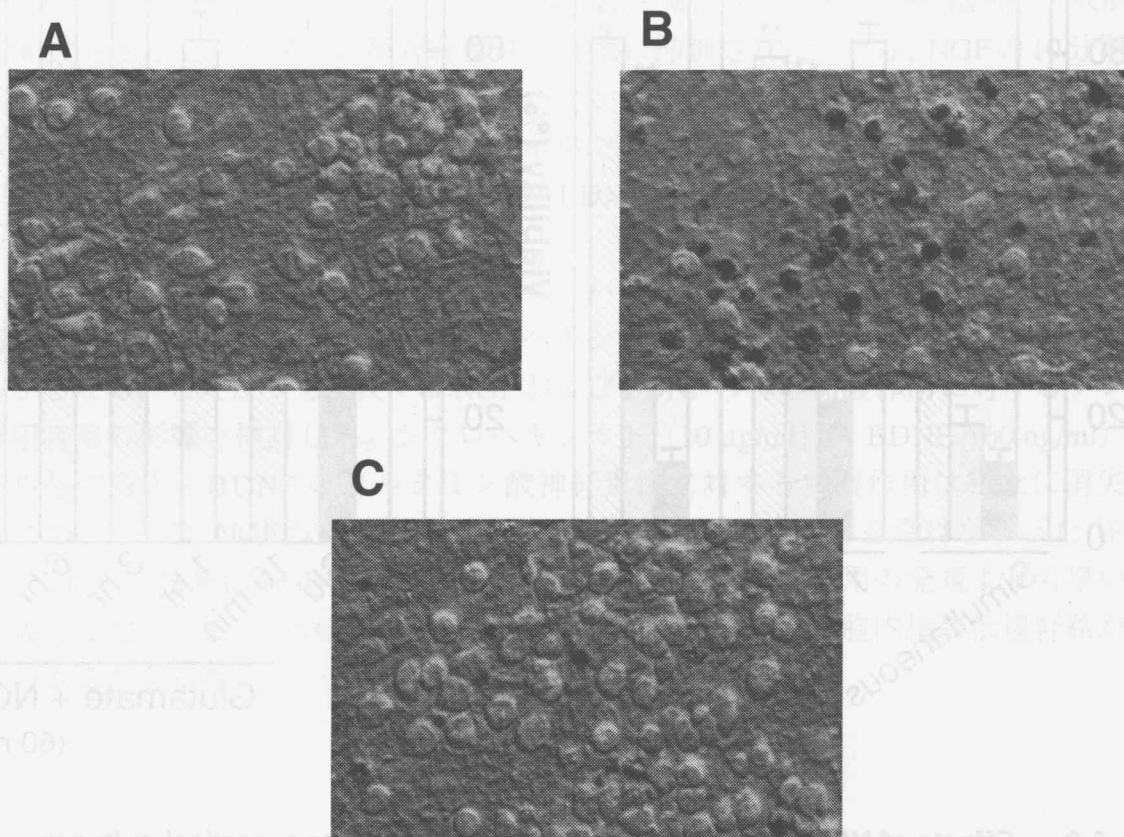
#### (7) データ処理

第1章実験方法(6)に同じ。

## 実験結果

### 第1節 グルタミン酸神経毒性に対する NGF の保護作用

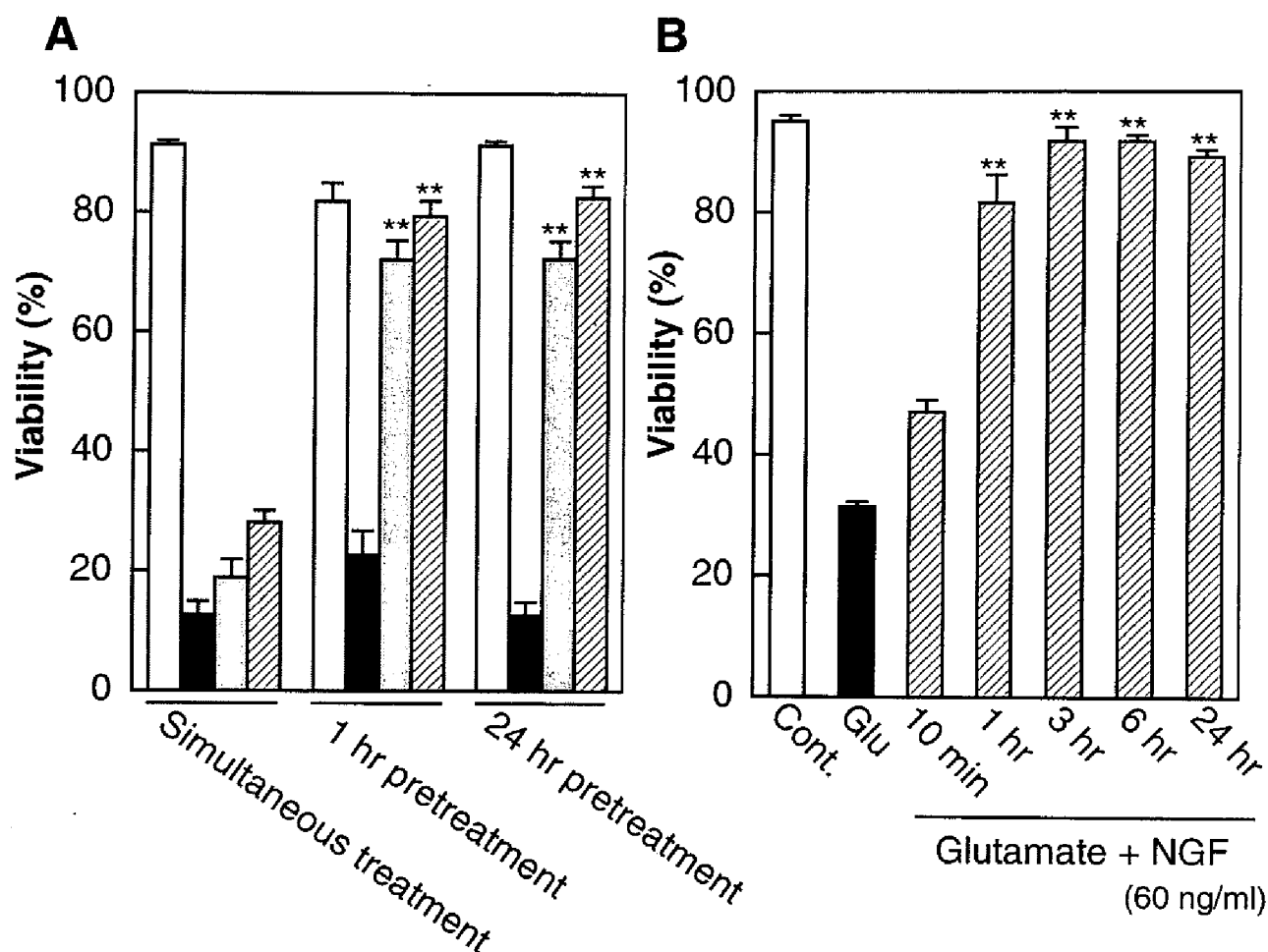
培養大脳皮質ニューロンにおいてNMDA受容体拮抗薬が短時間のグルタミン酸処置より誘発される神経毒性を抑制するので、NMDA受容体がグルタミン酸神経毒性に重要な役割を果たしていると考えられている[20, 75]。第2章において、100  $\mu$ Mのグルタミン酸



**Fig.3-1 Hoffman modulation contrast photomicrographs showing NGF-induced protection against glutamate neurotoxicity.**

Culture fields were photographed after trypan blue staining followed by formalin fixation. A, B and C show non-treated, 100  $\mu$ M glutamate-treated and 100  $\mu$ M glutamate- plus NGF-treated cultures, respectively. Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate for 10 min then incubated for 24 hr with standard medium. In C, the culture was pretreated with 60 ng/ml NGF for 24 hr prior to glutamate application. Calibration bar = 50  $\mu$ m.

を10分間投与し、その後、グルタミン酸を含まない培地で24時間インキュベートすることにより顕著な細胞死が誘発された。従って、我々は今回の研究において、この条件のグルタミン酸神経毒性を用いることにした。Fig. 3-1A-CはNGFによるグルタミン酸神経毒性に対する保護作用の典型例を示した。薬物無処置群では、トリパンブルーで染色さ



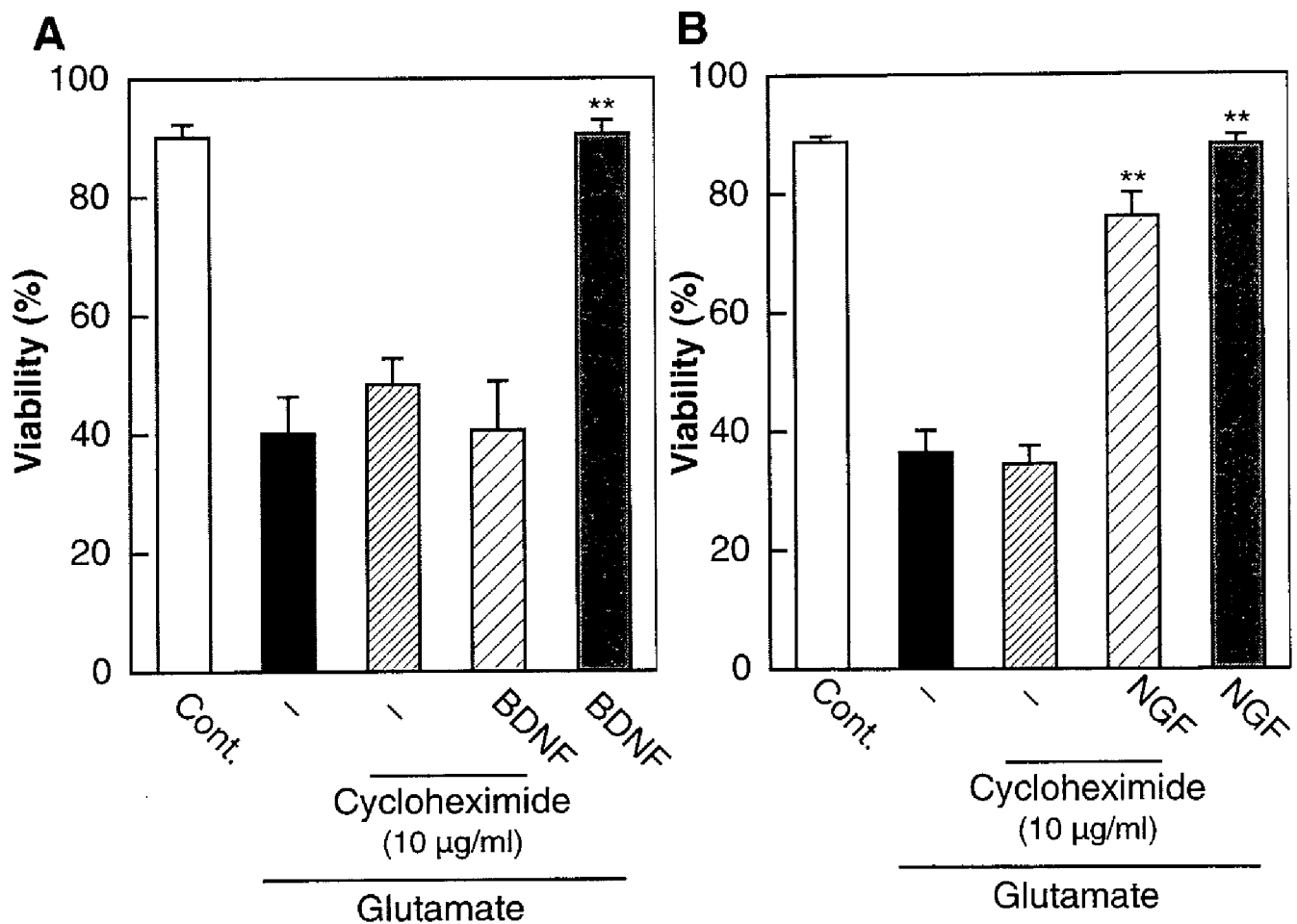
**Fig. 3-2 Effects of NGF on glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures.**

A, NGF prevented glutamate neurotoxicity in a concentration-dependent manner. Open columns: control. Filled columns: glutamate (100  $\mu$ M) alone. Dotted columns: glutamate plus 20 ng/ml NGF. Hatched columns: glutamate plus 60 ng/ml NGF. NGF was added to the glutamate-containing medium without pretreatment (simultaneous treatment) or added to pre-incubation medium prior to glutamate exposure (1-hr and 24-hr pretreatments). After pretreatment, NGF was not added to the glutamate-containing medium. B, NGF prevented glutamate neurotoxicity in a time-dependent manner. Cultures were exposed to 60 ng/ml NGF for 10 min-24 hr prior to glutamate (Glu).  $^{***}P < 0.01$ , compared with glutamate alone.

れる細胞がほとんど観察されなかったのに対して、グルタミン酸 (100  $\mu$ M) を 10 分間投与することにより染色される死亡細胞数が著明に増加したことから神経毒性が誘発されたことが確認された。NGF (60 ng/ml) を 24 時間前処置した細胞にグルタミン酸を投与したところ死亡細胞数は著明に減少し、グルタミン酸神経毒性がほぼ完全に抑制された。一方、NGF (60 ng/ml、24 hr) のみの投与は細胞の生存率に影響を及ぼさなかった。

NGF (20 もしくは 60 ng/ml) をグルタミン酸と同時に培地中に添加しても、生存率の回復傾向は見られるもののグルタミン酸神経毒性に対して有意な保護作用を示さなかった (Fig. 3-2A)。対照的にグルタミン酸投与の 1 時間前に NGF を培養細胞に前投与しておくとグルタミン酸神経毒性は顕著に抑制された。NGF の 24 時間の前投与においても 1 時間の際と同程度の神経保護作用が観察された。Fig. 3-2B に前投与時間を変化させて検討した際のグルタミン酸神経毒性に対する NGF の保護作用を示した。60 ng/ml の NGF を 1-24 時間投与するとグルタミン酸神経毒性は有意に抑制された。一方、NGF の 10 分間の前投与ではグルタミン酸神経毒性は抑制されなかった。第 2 章において BDNF がグルタミン酸神経毒性に対して完全な保護作用を示すためには 24 時間の前投与が必要であることを示した。これらのことより、NGF の方が BDNF よりも早く保護作用が発現することが示唆された。

ニューロトロフィンによる保護効果がタンパク合成を必要とするかどうかはこの保護作用がタンパク合成阻害薬であるシクロヘキシミドに感受性があるかを検討することで明らかとなる。したがって、我々は NGF および BDNF の神経保護作用に対するタンパク合成阻害薬の影響を検討した。シクロヘキシミド (10  $\mu$ g/ml) を BDNF (60 ng/ml) と同時に投与すると、BDNF のグルタミン酸神経毒性に対する保護作用は完全に消失した (Fig. 3-3A)。一方、NGF の保護作用は同様の処置によっても影響を受けなかった (Fig. 3-3B)。これらの結果は NGF の保護作用の発現が BDNF の保護作用の発現よりも早いことと一致しており、また、NGF と BDNF の保護作用に異なった細胞内情報伝達経路が関与していることを示唆している。



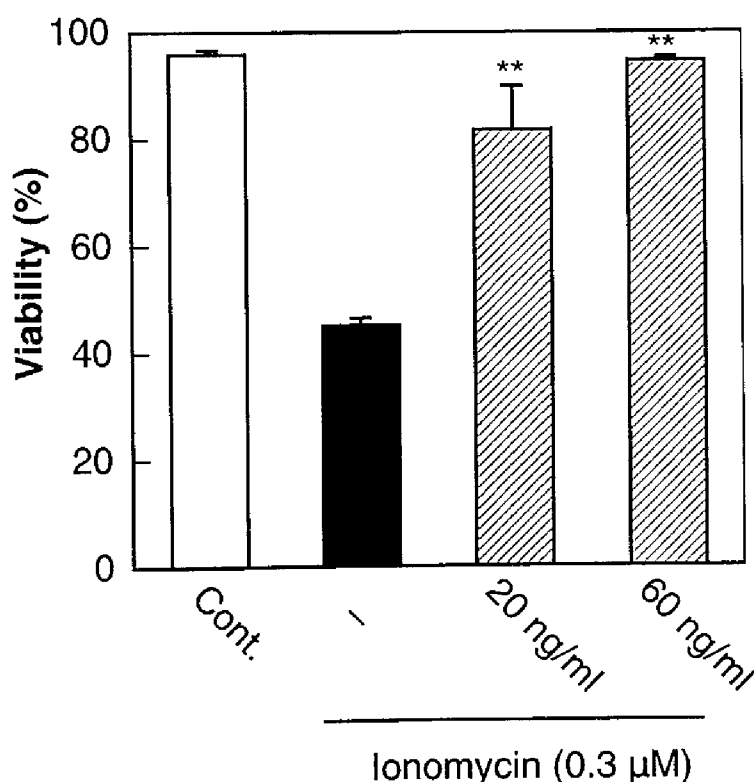
**Fig. 3-3 Effects of cycloheximide on the protective action of BDNF (A) and NGF (B).**

Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate for 10 min then incubated for 24 hr with standard medium. Cultures were pretreated with 60 ng/ml BDNF or NGF for 24 hr prior to the glutamate application. Cycloheximide was added to the neurotrophin-containing medium simultaneously. \*\* $P < 0.01$ , compared with glutamate alone.

## 第2節 カルシウムイオノフォアおよびNOドナー誘発神経毒性に対する NGF の保護作用

グルタミン酸神経毒性に関与するNMDA受容体はNMDA受容体のイオンチャネルを介する細胞内へのカルシウム流入に関与している。さらに培養大脳皮質ニューロンにおける検討においてカルシウムに依存して産生されたNOがNMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性を発現させる。それ故、我々はカルシウムイオノフォアとNOドナーによる神経細胞死に対するNGFの保護作用を検討した。このことによりNGFの神経保護作用メカニズムの一端が得られるかもしれない。

カルシウムイオノフォアであるイオノマイシン ( $0.3\ \mu\text{M}$ ) を大脳皮質ニューロンに10分間投与し、その後24時間イオノマイシンを含まない培地でインキュベートすることにより細胞生存率の顕著な減少が見られた (Fig. 3-4)。イオノマイシン投与の24時間前にNGF ( $20\text{--}60\ \text{ng/ml}$ ) を前投与しておくことによりイオノマイシン誘発神経毒性はほぼ完全に抑制された (Fig. 3-4)。次に、我々はNOドナーが誘発する毒性に対するNGFの作

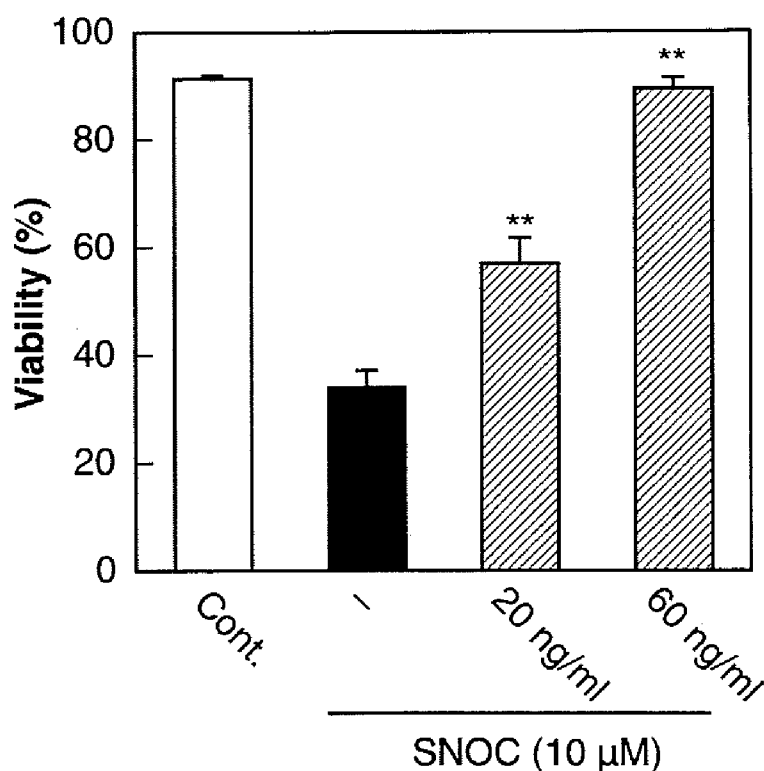


**Fig. 3-4 Effect of NGF on ionomycin-induced neurotoxicity in primary cortical cultures.**

Cultures were exposed to ionomycin for 10 min followed by a 24 hr incubation with normal medium. NGF was added for 24 hr prior to application of ionomycin. \*\* $P < 0.01$ , compared with ionomycin alone.

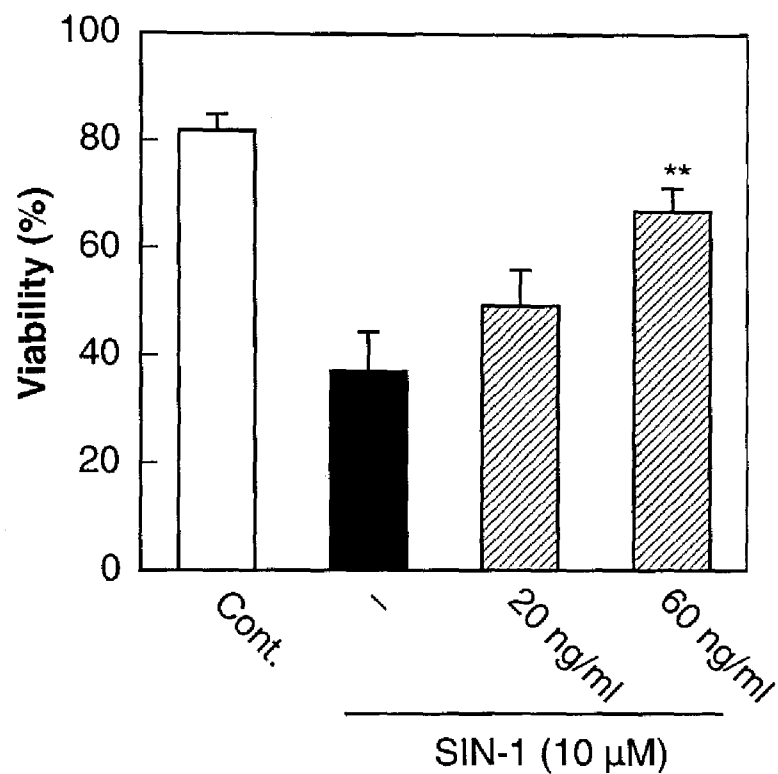


用を検討した。イオノマイシンの場合と同様に S- ニトロソシステイン (SNOC、10  $\mu$ M) もしくは 3-morpholinosydnonimine (SIN-1、10  $\mu$ M) の 10 分間の投与後、NO ドナーの含まれていない培地で 24 時間インキュベートすることにより顕著な細胞生存率の低下が見られた。NGF (20-60 ng/ml) は SNOC 誘発神経毒性に対して有意な保護作用を発現した (Fig. 3-5)。また、NGF は SIN-1 誘発神経毒性に対しても濃度依存的に保護作用を発現した (Fig. 3-6)。したがって、NGF の神経保護作用は少なくとも一部は NO の神経毒性の減弱に関与していると考えられる。



**Fig. 3-5 Effect of NGF on SNOC -induced neurotoxicity in primary cortical cultures.**

Cultures were exposed to SNOC for 10 min followed by a 24 hr incubation with normal medium. NGF was added for 24 hr prior to application of SNOC. \*\* $P < 0.01$ , compared with SNOC alone.



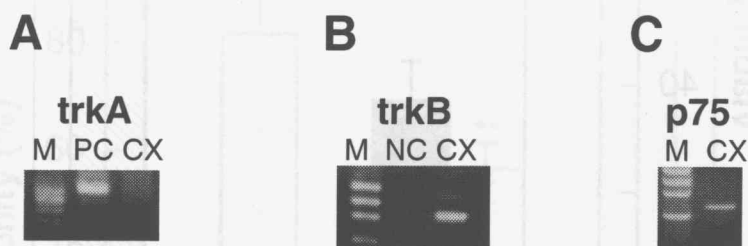
**Fig. 3-6 Effect of NGF on SIN-1-induced neurotoxicity in primary cortical cultures.**

Cultures were exposed to SIN-1 for 10 min followed by a 24 hr incubation with normal medium. NGF was added for 24 hr prior to application of SIN-1. \*\* $P < 0.01$ , compared with SIN-1 alone.

### 第3節 グルタミン酸神経毒性に対する NGF の保護作用

NGFは高親和性受容体のTrkAと低親和性受容体のp75の両方に結合する。NGFによる神経保護作用を担っている受容体を決定するために培養大脳皮質ニューロンにおけるニューロトロフィン受容体の発現について検討した。培養大脳皮質細胞から調製されたRNAにtrkA、trkB、p75の転写物が存在するかどうかを調べるためにRT-PCRを用いて検討した。Fig. 3-7に示すようにtrkBおよびp75の発現は確認されたが、trkAの発現は検出されなかった。

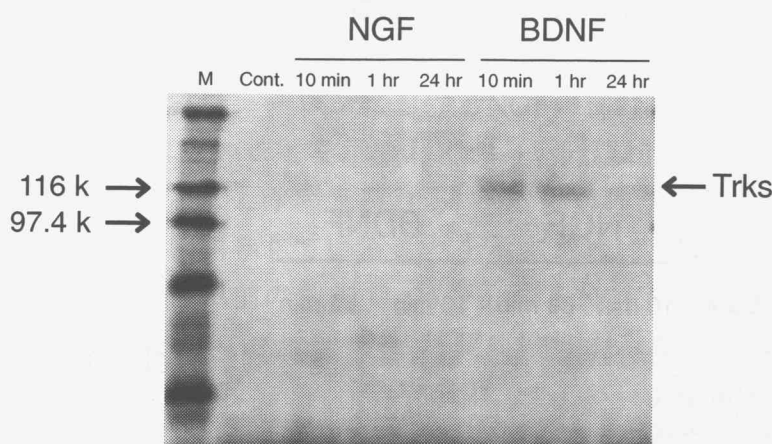
陽性対照として用いたPC12細胞においてはRT-PCRを用いてtrkAの発現が確認された。したがって、培養大脳皮質ニューロンにおけるtrkAの発現の欠如は手技による問題ではないと考えられる。



**Fig. 3-7 Detection of neurotrophin receptor mRNAs.**

RT-PCR was performed on total RNA isolated from cultured cortical neurons (CX) using trkA-specific primers (A), trkB-specific primers (B) or p75-specific primers (C). As a positive control for the detection of trkA mRNAs, RT-PCR was performed on RNA isolated from PC12 cells (PC). In B, as a negative control (NC), the RT reaction was performed without RNA.

Trk高親和性ニューロトロフィン受容体はリガンドの結合および活性化によってチロシンのリン酸化が引き起こされることが知られている。培養大脳皮質細胞においてニューロトロフィンによってTrkが活性化されるかどうかを確認する実験において、我々はTrkタンパクのチロシンリン酸化のタイムコースを検討した。培養大脳皮質ニューロンはNGF (60 ng/ml) もしくはBDNF (60 ng/ml) で示された時間処置された。両方の細胞溶解液は、抗Trk抗体により免疫沈降され、抗ホスホチロシン抗体でイムノブロットされた。C-14 Trk抗体は全てのTrkサブクラスを認識して免疫沈降するのに使用された。Fig.



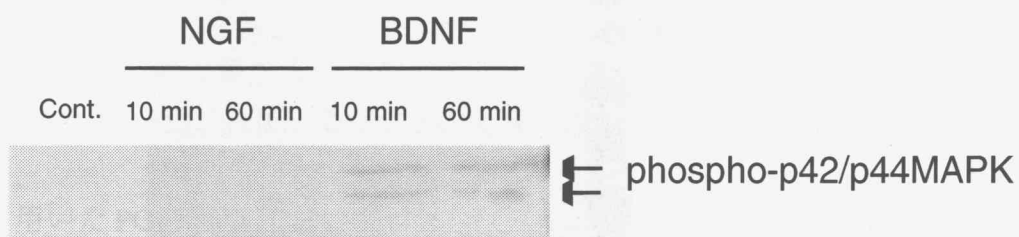
**Fig. 3-8 Effects of NGF and BDNF on the tyrosine phosphorylation of Trks in primary cortical cultures.**

Cortical cultures were treated with 60 ng/ml NGF or BDNF for the period indicated. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Trk antibody and subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), followed by immunoblotting with anti-phosphotyrosine antibody.

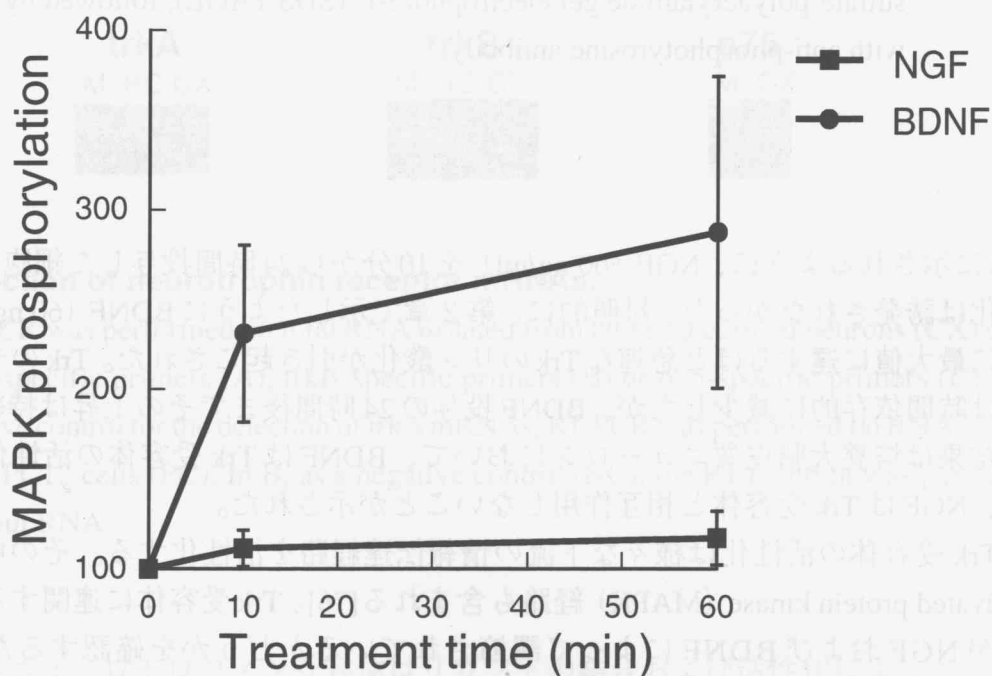
3-8に示されるように、NGF (60 ng/ml) を10分から24時間投与した細胞ではTrkのリン酸化は誘発されなかった。対照的に、第2章で示したようにBDNF (60 ng/ml) は10分までに最大値に達するほど急速なTrkのリン酸化が引き起こされた。Trkのチロシンリン酸化は時間依存的に減少したが、BDNF投与の24時間後までその上昇は持続した。これらの結果は培養大脳皮質ニューロンにおいて、BDNFはTrk受容体の活性化を引き起こすが、NGFはTrk受容体と相互作用しないことが示された。

Trk受容体の活性化は様々な下流の情報伝達経路を活性化する。その中にはmitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路も含まれる[76]。Trk受容体に連関する細胞内情報伝達がNGFおよびBDNFによって調節されているかどうかを確認するために、我々はMAPKのリン酸化を検討した。培養大脳皮質ニューロンにおいてリン酸化されて活性化したp42/p44 MAPKはBDNF (60 ng/ml) の投与後明らかに上昇した (Fig. 3-9)。BDNFとは明らかに異なってNGFはp42/p44 MAPKのリン酸化は上昇させなかった (Fig. 3-9)。

**A**



**B**

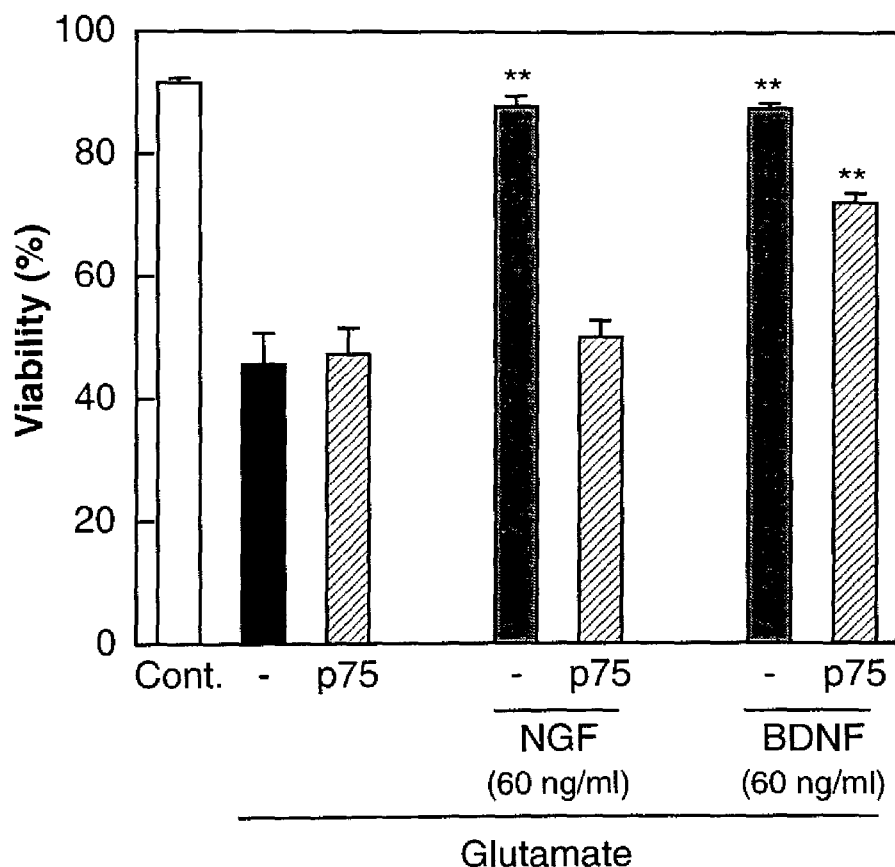


**Fig. 3-9 Effects of NGF and BDNF on the phosphorylation of MAPK in primary cortical cultures.**

A, Cultures were treated with either 60 ng/ml NGF or 60 ng/ml BDNF for the period indicated. Lysates were separated by SDS-PAGE and subjected to immunoblotting with anti-phosphoMAPK antibody. B, The western blot was quantified by densitometry.

#### 第4節 p75受容体によるNGF誘発神経保護への関与

前節の結果は培養大脳皮質ニューロンにおけるNGFの神経保護作用が高親和性受容体であるTrkAを介するのではないことを示唆しており、低親和性受容体であるp75受容体が重要な役割を果たしていることが考えられる。P75受容体が直接NGFのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用に関与していることを示すために、抗p75中和抗体の作用を検討した(Fig. 3-10)。この抗体は以前の報告でp75を介するNGFの作用を阻害することが示されている[77]。抗p75抗体(10 µg/ml)で24時間前投与することのみでは細胞の生存率に影響を与えなかった。しかしながら、抗p75抗体とNGF(60 ng/ml)を同時に投与することにより、NGFのグルタミン酸神経毒性に対する保護作用が完全に抑制された。対照的に、同様の方法で投与してもBDNF(60 ng/ml)の神経保護作用は少し減弱しただけであった。これらの結果はp75受容体がNGFの神経保護作用には重要な役割を果たしていることを示すものである。

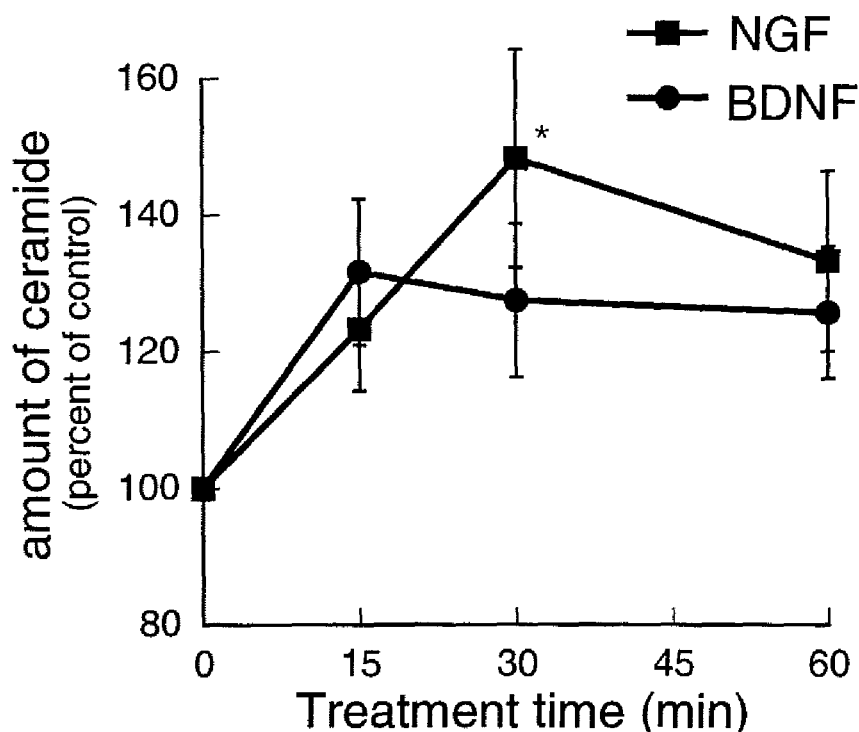


**Fig. 3-10 Effects of anti-p75 antibody on the protective effects of NGF and BDNF.**

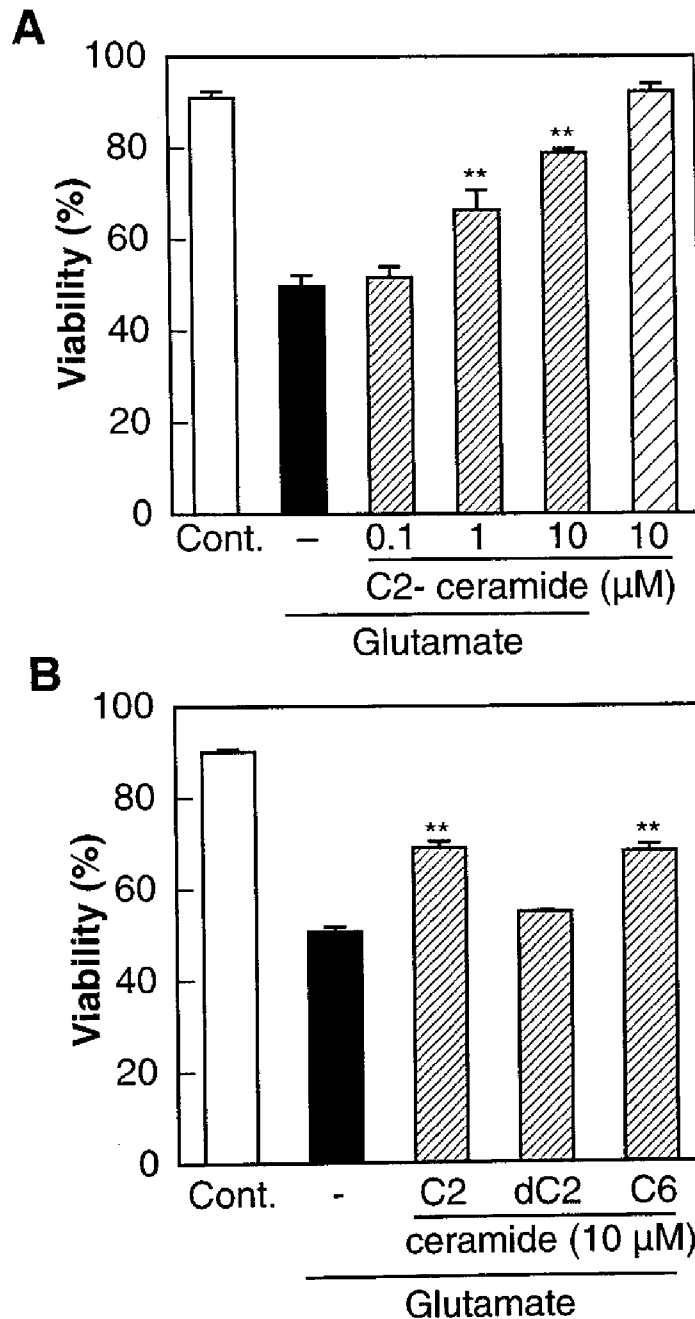
Cultures were exposed to 100 µM glutamate for 10 min then incubated for 24 hr with standard medium. Cultures were pretreated with 60 ng/ml NGF or BDNF for 24 hr prior to the glutamate application. Anti-p75 antibody (10 µg/ml) was added to the neurotrophin-containing medium. \*\* $P < 0.01$ , compared with glutamate alone.

ニューロトロフィンによるp75の刺激によりスフィンゴミエリンの加水分解が引き起こされ、その結果セラミドが産生されることが知られている[66]。培養大脳皮質ニューロンにおいてNGFがp75受容体を刺激するなら、細胞内セラミド濃度がNGFの投与によって増加することが期待される。それ故、我々はNGFもしくはBDNFを投与した培養大脳皮質細胞における細胞内セラミド濃度の変化を検討した (Fig. 3-11)。NGF (60 ng/ml) は有意に細胞内のセラミド濃度を上昇させ、NGFの投与開始から30分で最高値に達した。反対に同じ濃度のBDNFはわずかにセラミドの濃度を上昇させただけであった。これらの結果は大脳皮質ニューロンにおいてp75を介する情報伝達がNGFの作用には関与しているがBDNFの作用には関与していないことを示唆している。

最後に、我々はセラミドがグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を持つかどうかを検討した。この目的のために、我々はセラミドの膜透過性アナログであるC2-セラミドを用いた。C2-セラミドはグルタミン酸投与の24時間前に前投与しておく、濃度依存的にグルタミン酸神経毒性を抑制した (Fig. 3-12A)。その保護効果は0.1-10  $\mu$ Mの範囲で濃度依存的であった。同様に、他のセラミドのアナログであるC6-セラミド (10  $\mu$ M) は有意な保護作用を発現した。対照的に、C2-セラミドの不活性アナログであるジヒドロ-C2-セラミド (10  $\mu$ M) はグルタミン酸神経毒性を抑制しなかった (Fig. 3-12B)。



**Fig. 3-11 Stimulation of ceramide production by neurotrophins in cortical neurons.** After treatment of cortical cultures with 60 ng/ml NGF or BDNF for the period indicated, lipids were extracted and the amount of ceramide was quantified as described in Experimental Procedures. \* $P < 0.05$ , compared with control.



**Fig. 3-12 Effects of ceramide analogs on glutamate neurotoxicity.**

A, C2-ceramide prevents glutamate neurotoxicity in a concentration-dependent manner. Cultures were exposed to 100  $\mu$ M glutamate for 10 min then incubated for 24 hr with standard medium. Cultures were pretreated with C2-ceramide for 24 hr prior to the glutamate application. B, Dihydro-C2-ceramide (dC2) did not affect glutamate neurotoxicity, whereas C6-ceramide afforded neuroprotection. Cultures were exposed to 500  $\mu$ M glutamate for 10 min then incubated for 24 hr with standard medium. Cultures were pretreated with ceramides for 24 hr prior to the glutamate application. \*\* $P < 0.01$ , compared with glutamate alone.



## 考 察

今回の研究で、培養大脳皮質ニューロンにおいてNGFがグルタミン酸神経毒性に対して強力な保護作用を持つことが明らかとなった。新知見としてはNGFの神経保護作用が低親和性ニューロトロフィン受容体であるp75を介して発現することである。この結論は以下の知見に基づいている。

- (1) 抗p75中和抗体がNGFの神経保護作用を消失させた。
- (2) NGFがp75刺激後に引き起こされると考えられている細胞内セラミド濃度の上昇を引き起こした。
- (3) 外因性に投与したセラミドのアナログがNGFと同様の作用を示した。

反対に、培養大脳皮質ニューロンでは高親和性受容体であるTrkAはNGFの保護作用には関与していないようである。それは以下の知見に基づいている。

- (1) 検出可能なtrkAの発現が見られない。
- (2) NGFがTrkタンパクのリン酸化を引き起こさない。
- (3) NGFがTrkの活性化の後に引き起こされると考えられるp42/p44 MAPKのリン酸化を引き起こさない。

p75を介して発現するNGFの生物学的作用に関しては様々な知見が報告されている。例えば、培養中脳ニューロンではp75を介してNGFによってドパミンの遊離が引き起こされるが、BDNFでは引き起こされない[78]という報告がある。また、細胞の生存や死に関しては、培養オリゴデンドロサイト[68]や網膜細胞[67]におけるTrkAの非存在下でのp75を介するNGFの作用が示されている。しかしながらこれらの報告ではNGFは保護作用は発現せず、むしろそれ自身で細胞死を引き起こす。反対に、p75とTrkAの両方が発現している細胞においてはp75とTrkAがTrkAのみよりも高親和性の受容体複合体を形成し、NGFの神経栄養効果を促進する[69]。しかしながら、この場合にはNGFの神経栄養効果はTrkAを介した細胞内情報伝達を駆動していると考えられている。NGFがp75刺激を介して培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性を抑制するという今回の知見は、NGFによる神経保護作用の新しいメカニズムを明らかにしている。

p75刺激によって動かされる情報伝達系はあまり知られていないが、よく知られた細胞反応はスフィンゴミエリンサイクルの促進である[66]。p75とNGFの結合は膜のスフィンゴ脂質を加水分解するスフィンゴミエリナーゼを活性化する。その結果、セラミドが産生され、セカンドメッセンジャーとして働き、ceramide-activated protein kinaseやnuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)を含む様々な細胞内機能分子を活性化する。今回、NGFが培養大脳皮質細胞でセラミドの産生を増加させることを示した。さらに、セラミドのアナログの添加によりグルタミン酸神経毒性から培養大脳皮質ニューロンを保護した。C2-セラミドが海馬ニューロンの細胞死を抑制し、その抑制作用にNF- $\kappa$ Bが関与していることが以前に報告されている[79]。Bargerらはp75と同じ受容体ファミリーである腫瘍壊死因子受容

体への刺激がNF- $\kappa$ B 依存性の転写を介して海馬ニューロンの抗酸化作用を増強させるということを報告している[80]。同様のメカニズムが今回の研究で見られたNGFの保護作用にも働いているのかもしれない。

今回の研究からNGFとBDNFの神経保護作用は非常に異なったシグナル伝達を介していることが示された。NGFとBDNFの作用における異なったメカニズムを示しているのはタンパク合成阻害への感受性である。BDNFの保護作用はシクロヘキシミドによって阻害されているが、NGFの作用は阻害されない。このことはBDNFの保護作用には新規のタンパク合成が関与しているのに対し、NGFの保護作用には関与していないことを示している。タンパク合成が保護作用に関与しているかどうかは、NGFおよびBDNFがその作用を発現するのに必要な時間にも反映していると考えられる。第2章で示したように、BDNFはグルタミン酸神経毒性を完全に阻害するのに24時間の前投与が必要であるが、NGFの保護作用が発現するのはもっと早くからである。実際、NGFは1時間の前投与で強力な保護作用を発現している。

BDNFの作用がNGFの作用と顕著に異なっている点は、抗p75中和抗体を同時に入れても保護作用があまり減弱しなかった点である。この結果はBDNFの保護作用にp75が関与していたとしてもその寄与は少ないことを示している。培養大脳皮質ニューロンにおいてp75が存在するにも関わらずBDNFの作用が発現されないのは奇妙ではある。この説明としては、高親和性受容体であるTrkが存在する条件ではニューロトロフィンによる作用はTrkに関連した細胞内情報伝達が優位に働くということが考えられる。他の可能性としては、BDNFがp75に結合したとしてもその下流の情報伝達を駆動しないということが考えられる。NGFの添加より培養オリゴデンドロサイトにおいてセラミドの産生が誘発されるが、他のニューロトロフィンではセラミド産生が起こらないという報告[68]はこの考えと一致している。さらに、NGFによるp75への刺激はシュワン細胞においてNF- $\kappa$ Bの活性化を引き起こすが、BDNFおよびNT-3ではその作用は見られないという報告もある[81]。実際、BDNFでは培養大脳皮質細胞においてセラミド量の有意な増加は観察されず、BDNFの投与後にp75を介する細胞内情報伝達が活性化されていないと考えられる。対照的に、trkB転写物の存在することおよびTrk、p42/p44 MAPKのリン酸化がBDNFにより引き起こされることから培養大脳皮質ニューロンで見られるBDNFによる保護作用はBDNFの高親和性受容体であるTrkBの寄与が大きいと考えられる。

Kohらは、マウス胎仔由来ニューロン・グリア混合大脳皮質カルチャーにおける酸素・グルコース欠乏およびNMDA処置により誘発される細胞死をBDNFは増強するが、NGFにはその作用がないことを報告した[57]。今回の結果とKohらの結果との矛盾を明確には説明できないが、動物種や培養細胞の調整方法、薬物の投与方法など様々な実験条件の違いが関与しているのかもしれない。

NMDA受容体を介するグルタミン酸神経毒性は以下のように考えられている[19, 51, 62]。

- (1) グルタミン酸によるNMDA-gatedイオンチャネルの活性化によるカルシウムイオンの流入。
- (2) カルシウムイオンがカルモジュリンと結合することによるNOSの活性化およびNO産生の促進。
- (3) NOとスーパーオキシドアニオンの反応によるニューロンを細胞死に導くペルオキシナイトライトの産生。

細胞内にカルシウム流入を引き起こすイオノマイシンおよびNOを自発的に産生するSNOCはニューロン死を上述の1および2の段階により引き起こすと考えられる。SIN-1はNOとスーパーオキシドアニオンを同時に遊離することにより、結果としてペルオキシナイトライトを形成する[62]。従って、我々はSIN-1はニューロン死を3の段階から引き起こすと考えている。今回、NGFはイオノマイシンおよび2つの異なったタイプのNOドナーの誘発する神経毒性を抑制した。それゆえ、NGF処置された大脳皮質ニューロンはペルオキシナイトライトが誘発する神経毒性に対して耐性を獲得したと考えられる。

ChengとMattson[71]およびChengら[72]は培養海馬ニューロンや培養大脳皮質ニューロンにおいて細胞内のカルシウムホメオスタシスを安定化することによって興奮毒性や代謝障害からNGFがニューロンを保護することを報告した。NGFがNOドナーが誘発する神経毒性を抑制するという我々の報告はNGFの保護作用が細胞内カルシウムの増加よりも下流のメカニズムに働いていることを示しているが、NMDA受容体の機能およびカルシウムイオン制御に関する知見はNGFの神経保護作用の正確なメカニズムを知るための有用な情報を与えるかもしれない。

著者らは前章においてBDNFもカルシウムイオノフォアおよびNOドナーによる神経細胞死を抑制することを明らかにした。言い換えるとNGFとBDNFが異なる細胞内情報伝達系を駆動するにも関わらず同様に保護作用を示すことは、神経保護作用のメカニズムを発現するのに共通の標的が細胞死誘発経路の中に含まれていることを示している。ペルオキシナイトライトによる細胞死に関与した正確な標的分子に関しては更なる検討が必要である。

## 総括および結論

本研究において、著者はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索が臨床上有効な神経保護薬の開発につながると考え、ラット胎仔由来初代培養大脳皮質ニューロンを用いた実験系において、グルタミン酸神経毒性の機序の解析およびグルタミン酸神経毒性を抑制する内在性物質の探索を進め、以下の新知見を得た。

1、グルタミン酸誘発ニューロン死におけるPLC- $\delta$ の発現の変化について検討した結果、グルタミン酸の処置により、抗PLC- $\delta$ 抗体の免疫染色性が増加し、PLC- $\delta$ の発現がグルタミン酸の濃度に依存して上昇することを示した。グルタミン酸によるPLC- $\delta$ の発現の上昇はNMDA受容体阻害薬であるMK-801およびNO合成酵素阻害薬であるN<sup>ω</sup>-nitro-L-arginineによって抑制された。以上の結果からNMDA受容体の活性化によるNO産生がアルツハイマー病で見られるのと同様のPLC- $\delta$ の制御を導くことが示唆された。

2、ニューロトロフィンの一つであるBDNFのグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した結果、BDNFを前投与することにより濃度依存的にグルタミン酸神経毒性を抑制することを明らかにした。BDNFの高親和性受容体であるTrkBのチロシンリン酸化による活性化も確認され、BDNFの神経保護作用が高親和性受容体のTrkBを介して発現することが示唆された。カルシウムイオノフォアのイオノマイシン、NOドナーのSNOCおよびSIN-1の毒性に対してもBDNFは、24時間の前処置により保護作用を発現した。NOは活性酸素と反応してONOO<sup>•</sup>となり神経細胞死を惹起するが、BDNFはONOO<sup>•</sup>を直接生成するSIN-1の神経毒性も抑制した。したがって、BDNFはNOの関与するラジカルの毒性に対する神経細胞の抵抗性を増強することにより保護作用を発現すると考えられる。

3、ニューロトロフィンファミリーのプロトタイプであるの神経成長因子（NGF）のグルタミン酸神経毒性に対する作用を検討した結果、BDNFと同様にグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現した。BDNFと同様にイオノマイシン、SNOCおよびSIN-1の毒性に対する効果を検討したところ、NGFは、イオノマイシン、SNOCおよびSIN-1誘発神経毒性を抑制した。したがって、NGFはBDNFと同様にNOの関与するラジカルの毒性に対する神経細胞の抵抗性を増強することにより保護作用を発現すると考えられる。

BDNFとNGFはグルタミン酸神経毒性に対して同様の保護作用を示したので、その保護作用メカニズムについて検討した。ニューロトロフィンの高親和性受容体刺激に続いてMAPKの活性化が引き起こされることが報告されているので、BDNFおよびNGFによるMAPKの活性化について検討した。BDNF処置によりMAPKが活性化されたのに対し、NGF処置ではMAPK活性に影響を与えなかった。したがって、BDNFの保護作用には高親和性受容体であるTrkBが関与することが示唆された。ニューロトロフィンの低親和性

受容体である p75 受容体に対する抗体を BDNF、NGF と同時に前投与すると、BDNF の保護作用が少し抑制されたのに対し、NGF の保護作用は完全に抑制された。さらに p75 受容体の下流の情報伝達経路と考えられているセラミドの産生について検討したところ、BDNF と比較して NGF はセラミド産生を亢進した。以上の結果より、BDNF の保護作用は高親和性受容体である TrkB を介して発現するのに対し、NGF の保護作用は低親和性受容体である p75 受容体を介して発現することが示唆される。

以上、著者は培養大脳皮質ニューロンにおけるグルタミン酸神経毒性にアルツハイマー病で見られる PLC- $\delta$  の発現上昇が見られること、また、内在性の保護物質としてニューロトロフィンである NGF、BDNF がグルタミン酸神経毒性に対して保護作用を発現することを示した。NGF の保護作用にはその低親和性受容体である p75 受容体が、また BDNF の保護作用には高親和性受容体である TrkB が重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究の成果はグルタミン酸神経毒性を抑制する内因性物質の探索における有用な知見となるとともに、神経変性疾患に有効な予防・治療薬の開発において重要な基礎的資料を提供するものである。

## 謝 辞

本研究に際しまして、終始懇切な御指導と御鞭撻を賜りました京都大学大学院薬学研究科 赤池昭紀 教授に謹んで感謝の意を表します。また、本研究をまとめるにあたり多くの有益なご助言をいただいた京都大学大学院医学研究科 下濱 俊 講師に心から感謝の意を表します。さらに、終始有益なご助言をいただきました京都大学大学院薬学研究科 佐藤公道 教授、金子周司 助教授、香月博志 助教授、南 雅文 助教授、並びに、現和歌山県立医科大学 前田武彦 講師に深く感謝いたします。

本研究にご協力いただきました金子 智修士、火原光裕学士、船越華江修士、西川弘之博士、富岡宏子修士、並びに薬品作用解析学分野、生体機能解析学分野、医療薬理学分野の諸氏に深く感謝いたします。

最後に、研究に専心できる自由を与えてくださり、著者のよき理解者でもある、父 啓之、母 千代子に心から感謝いたします。

# 発表論文目録

本研究の内容の大部分は以下の論文に公表した。

- 1) Shimohama, S., Akaike, A., Tamura, Y., Matsuhima, H., Kume, T., Fujimoto, S., Takenawa, T. and Kimura, J.  
Glutamate-induced antigenic changes of phospholipase C- $\delta$  in cultured cortical neurons  
*J. Neurosci. Res.*, **41**, 418-426 (1995)
- 2) Kume, T., Kouchiyama, H., Kaneko, S., Maeda, T., Kaneko, S., Akaike, A., Shimohama, S., Kihara, T., Kimura, J., Wada, K. and Koizumi, S.  
BDNF prevents NO mediated glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons  
*Brain Res.*, **756**, 200-204 (1997)
- 3) Kume, T., Nishikawa, H., Tomioka, H., Katsuki, H., Akaike, A., Kaneko, S., Maeda, T., Kihara, T. and Shimohama, S.  
p75-mediated neuroprotection by NGF against glutamate cytotoxicity in cortical cultures  
*Brain Res.*, **852**, 279-289 (2000)

## 参考論文目録

- 1) 赤池 昭紀、久米 利明  
内在性保護因子によるニューロン死の制御  
*Folia Pharmacol. Jpn.*, **112**, 177-186 (1998)
- 2) Akaike, A., Katsuki, H., Kume, T. and Maeda, T.  
Reactive oxygen species in NMDA receptor-mediated glutamate neurotoxicity  
*Parkinsonism and Related Disorders*, **5**, 203-207 (1999)



## 引用文献

1. Wilcock GK, Esiri MM: Plaques, tangles and dementia: A qualitative study. *J. Neurol. Sci.* **561**, 343-356 (1982)
2. Berridge MJ, Irvine RF: Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* **312**, 315-321 (1984)
3. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H: The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* **234**, 1519-1526 (1986)
4. Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 1365-1370 (1986)
5. Nishizuka Y: The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* **334**, 661-665 (1988)
6. Rhee SG, Suh PG, Ryu SH, Lee SY: Studies of inositol phospholipid-specific phospholipase C. *Science* **244**, 546-550 (1989)
7. Shimohama S, Homma S, Suenaga T, Fujimoto S, Taniguchi T, Araki W, Yamaoka Y, Takenawa T, Kimura J: Aberrant accumulation of phospholipase C- $\delta$  in Alzheimer brains. *Am. J. Pathol.* **139**, 737-742 (1991)
8. Shimohama S, Fujimoto S, Tresser N, Richey P, Perry G, Whitehouse PJ, Homma Y, Takenawa T, Taniguchi T, Suenaga T, Kimura J: Aberrant phosphoinositide metabolism in Alzheimer's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* **695**, 46-49 (1993)
9. Shimohama S, Perry G, Richey P, Praprotnic S, Takenawa T, Fukami K, Whitehouse PJ, Kimura J: Characterization of the association of phospholipase C- $\delta$  with Alzheimer's neurofibrillary tangles. *Brain Res.* **669**, 217-224 (1995)
10. Choi DW: Calcium-mediated neurotoxicity: Relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trend Neurosci.* **11**, 465-469 (1988)

11. Choi DW, Maulucci-Gedde M, Kriegstein AR: Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357-368 (1987)
12. Choi DW, Viseskul V, Amirthanayagam M, Monyer H: Aspartate neurotoxicity on cultured cortical neurons. *J. Neurosci. Res.* **23**, 116-121 (1989)
13. Hartley DM, Choi DW: Delayed rescue of *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated neuronal injury in cortical culture. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 752-758 (1989)
14. Ogura A, Miyamoto M, Kudo Y: Neuronal death in vitro: Parallelism between survivability of hippocampal neurons and sustained elevation of cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  after exposure to glutamate receptor agonist. *Exp. Brain Res.* **73**, 447-458 (1988)
15. Michaels RL, Rothman SM: Glutamate neurotoxicity in vitro: Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J. Neurosci.* **10**, 283-292 (1990)
16. Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Ozaki K, Matsuoka R, Miura S, Yoshinaga T: Colecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against glutamate neurotoxicity. *Brain Res.* **557**, 303-307 (1991)
17. Mattson MP: Antigenic changes similar to those seen in neurofibrillary tangles are elicited by glutamate and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in cultured hippocampal neurons. *Neuron* **2**, 105-117 (1990)
18. Homma Y, Emori Y, Shibasaki F, Suzuki K, Takenawa T: Isolation and characterization of a  $\gamma$ -type phosphoinositide-specific phospholipase C (PLC- $\gamma$ 2). *Biochem. J.* **269**, 13-18 (1990)
19. Dawson VL, Dawson TM, London ED, Brecht DS, Snyder SH: Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**, 6368-6371 (1991)
20. Tamura Y, Sato Y, Akaike A, Shiomi H: Mechanisms of cholecystokinin-induced protection of cultured cortical neurons against *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* **592**, 317-325 (1992)
21. Dawson VL, Dawson TM, Bartley DA, Uhl GR, Snyder SH: Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures. *J. Neurosci.* **13**, 2651-2661 (1993)

22. Shimohama S, Perry G, Richey P, Takenawa T, Whitehouse PJ, Miyoshi K, Suenage T, Matsumoto S, Nishimura M, Kimura J: Abnormal accumulation of phospholipase C- $\delta$  in filamentous inclusions of human neurodegenerative disease. *Neurosci. Lett.* **162**, 183-186 (1993)
23. Shimohama S, Fujimoto S, Matsushima H, Takenawa T, Fukami K, Whitehouse PJ, Kimura J: Alteration of phospholipase C- $\delta$  protein level and specific activity in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **64**, 2629-2634 (1995)
24. Pawelczyk T, Lowenstein JM: Binding of phospholipase C $\delta$ 1 to phospholipid vesicles. *Biochem. J.* **291**, 693-696 (1993)
25. Mattson MP: Second messengers in neuronal growth and degeneration. In Osborne N(ed): "Current Aspects of the Neurosciences." Vol 2. New York: Macmillan, pp 1-48.(1990)
26. Mattson MP, Rychlik B, Engle MG: Possible involvement of calcium and inositol phospholipid signalling pathways in neurofibrillary degeneration. In Iqbal K, McLachlan DRC, Winblad B, Wisniewski HM (eds): "Alzheimer's Disease: Basic Mechanisms, Diagnosis and Therapeutic Strategies." New York: John Wiley & Sons, pp 191-198 (1991)
27. Mattson MP: Calcium as sculptor and destroyer of neuronal circuitry. *Exp. Gerontol* **27**, 29-49 (1992)
28. Selkoe D: Deciphering Alzheimer's disease: The amyloid precursor protein yields new clues. *Science* **248**, 1058-1060 (1990)
29. Whitson JS, Selkoe DJ, Cotman W: Amyloid  $\beta$ -protein enhances the survival of hippocampal neurons in vitro. *Science* **243**, 1488-1490 (1989)
30. Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA: Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid  $\beta$  protein: Reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* **250**, 279-282 (1990)
31. Kimura H, Schubert D: Amyloid  $\beta$ -protein activates tachykinin receptors and inositol trisphosphate accumulation by synergy with glutamate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 7508-7512 (1993)

32. Koh JY, Yang LL, Cotman CW:  $\beta$ -Amyloid protein increases the vulnerability of cultured cortical neurons to excitotoxic damage. *Brain Res.* **533**, 315-320 (1990)
33. Mattson MP, Cheng B, Davis D, Bryant K, Lieberburg I, Rydel RE:  $\beta$ -Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.* **12**, 376-389 (1992)
34. Levi-Montalcini R: The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J.* **6**, 1145- 1154 (1987)
35. Levi-Montalcini R, Skaper SD, Dal-Toso R, Petrelli L, Leon A: Nerve growth factor: from neurotrophin to neurokine. *Trends Neurosci.* **19**, 514-520 (1996)
36. Barde YA: Neurotrophic factors: an evolutionary perspective. *J. Neurobiol.* **25**, 1329-1333 (1994)
37. Leinbrock J, Lottspeich F, Hohn A, Hofer M, Hengeler A, Masiakowski P, Thoenen H, Barde YA: Molecular cloning and expression of brain-derived neurotrophic factor. *Nature* **341**, 149-152 (1989)
38. Chao MV, Hempstead BL: p75 and Trk: a two receptor system. *Trends Neurosci.* **18**, 321-326 (1995)
39. Bredesen DE, Rabizadeh S: p75NTR and apoptosis: Trk-dependent and Trk-independent effects. *Trends Neurosci.* **20**, 287-290 (1997)
40. Martin-zanca D, Hughes SH, Barbacid M: A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. *Nature* **319**, 743-748 (1986)
41. Klein R, Parada LF, Coulier F, Barbacid M: trkB, a novel tyrosine protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* **8**, 3701-3709 (1989)
42. Lamballe F, Klein R, Barbacid M: trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* **66**, 967-979 (1991)
43. Barbacid M: The Trk family of neurotrophin receptors. *J. Neurobiol.* **25**, 1386-1403 (1994)

44. Kaplan DR, Stephens RM: Neurotrophin signal transduction by the Trk receptor. *J. Neurobiol.* **25**, 1404-1417 (1994)
45. Stephens RM, Loeb DM, Copeland TD, Pawson T, Greene LA, Kaplan DR: Trk receptors use redundant signal transduction pathways involving SHC and PLC- $\gamma$ 1 to mediate NGF responses. *Neuron* **12**, 691-705 (1994)
46. Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal C, Olson L, Persson H: Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* **5**, 511-526 (1990)
47. Phillips HS, Hains JM, Laramée GR, Rosenthal A, Winslow JW: Widespread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neurons. *Science* **250**, 290-294 (1990)
48. Ghosh A, Carnahan J, Greenberg ME: Requirement for BDNF in activity-dependent survival of cortical neurons. *Science* **263**, 1618-1623 (1994)
49. Tsukahara T, Yonekawa Y, Tanaka K, Ohara O, Watanabe S, Kimura T, Nishijima T, Taniguchi T: The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain experimental study. *Neurosurgery* **34**, 323-331 (1994)
50. Meldrum B, Garthwaite J: Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *Trends Pharmacol. Sci.* **11**, 379-387 (1990)
51. Akaike A, Tamura Y, Terada K, Nakata, N. Regulation by neuroprotective factors of NMDA receptor mediated nitric oxide synthesis in the brain and retina. *Prog. Brain Res.* **103**, 391-403 (1994)
52. Huang Z, Huang PL, Panahian N, Dalkara T, Fishman MC, Moskowitz MA: Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase. *Science* **265**, 1883-1885 (1994)
53. Izumi Y, Benz AM, Clifford DB, Zorumski CF: Nitric oxide inhibitors attenuate *N*-methyl-D-aspartate excitotoxicity in rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **135**, 227-230 (1992)

54. Shimohama S, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Ohara O, Watanabe S, Kimura J: Brain-derived neurotrophic factor pretreatment exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci. Lett.* **164**, 55-58 (1993)
55. Cheng B, Mattson MP: NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* **640**, 56-67 (1994).
56. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H: Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur. J. Neurosci.* **5**, 1455-1464 (1993)
57. Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW: Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* **268**, 573-575 (1994)
58. Klein R, Nandru V, Jing S, Lamballe F, Tapely P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt L, Barbacid M: The trkB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* **66**, 395-403 (1991)
59. Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, Nikolics K, Parada LF: The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* **65**, 895-903 (1991)
60. Akaike A, Kaneko S, Tamura Y, Nakata N, Shiomi H, Ushikubi F, Narumiya S: Prostaglandin E2 protects cultured cortical neurons against *N*-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate cytotoxicity. *Brain Res.* **663**, 237-243 (1994)
61. Lei SZ, Pan ZH, Aggarwal SK, Chen HSV, Hartman J, Sucher NJ, Lipton SA: Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. *Neuron* **8**, 2087-2099 (1992)
62. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Vincent Chen JS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ and Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* **364**, 626-632 (1993)
63. Jackson GR, Apffel L, Werrbach-Perez K, Perez-Polo JR: Role of nerve growth factors in oxidant-antioxidant balance and neuronal injury. I. Stimulation of hydrogen peroxide

resistance. *J. Neurosci. Res.* **25**, 360-368 (1990)

64. Zhang Y, Tatsuo T, Carney JM, Mattson MP: Basic FGF, NGF and IGF-II protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **13**, 378-388 (1993)
65. Urschel BA, Hulsebosch CH: Distribution and relative density of p75 nerve growth factor receptors in the rat brain as a function of age and treatment with antibodies to nerve growth factor. *Brain Res.* **591**, 223-238 (1992)
66. Dobrowsky RT, Werner MH, Castellino AM, Chao MV, Hannun YA: Activation of the sphingomyelin cycle through the low-affinity neurotrophin receptor. *Science* **265**, 1596-1599 (1994)
67. Frade JM, Rodriguez-Tebar A, Brade YA: Induction of cell death by endogenous nerve growth factor through its p75 receptor. *Nature* **383**, 166-168 (1996)
68. Casaccia-Bonofil P, Carter BD, Dobrowsky RT, Chao MV: Death of oligodendrocytes mediated by the interaction of nerve growth factor with its receptor p75. *Nature* **383**, 716-718 (1996)
69. Mahadeo D, Kaplan L, Chao MV, Hampstead BL: High affinity nerve growth factor binding displays a faster rate of association than p140trk binding. Implications for multisubunit polypeptide receptors.: *J. Biol. Chem.* **269**, 6884-6891 (1994)
70. Shimohama S, Ogawa N, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Iwata H, Kimura J: Protective effect of nerve growth factor against glutamate-induced neurotoxicity in cultured cortical neurons. *Brain Res.* **632**, 296-305 (1993)
71. Cheng B, Mattson MP: NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron.* **7**, 1031-1041 (1991)
72. Cheng B, McMahon DG, Mattson MP: Modulation of calcium current, intracellular calcium levels and cell survival by glucose deprivation and growth factors in hippocampal neurons. *Brain Res.* **607**, 275-285 (1993)

73. Koliatsos VE, Clatterbuck RE, Nauta HJ, Knusel B, Burton LE, Hefti FF, Mobley WC, Price DL: Human nerve growth factor prevents degeneration of basal forebrain cholinergic neurons in primates. *Ann. Neurol.* **30**, 831-840 (1991)
74. Watts JD, Gu M, Polverino AJ, Patterson SD, Aebersold R: Fas-induced apoptosis of T cells occurs independly of ceramide generation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 7292-7296 (1997)
75. Choi DW, Koh J, Peters S: Pharmacology of glutamate neurotoxicity in cortical cell culture: attenuation by NMDA receptor antagonists. *J. Neurosci.* **8**, 185-196 (1988)
76. Gomez N, Cohen P: Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* **353**, 170-173 (1991)
77. Baker PA, Shooter EM: Disruption of NGF binding to the low affinity neurotrophin receptor p75LNTR reduces NGF binding to TrkA on PC12 cells. *Neuron* **13**, 203-215 (1994)
78. Blochl A, Sirrenberg C: Neurotrophins stimulate the release of dopamine from rat mesencephalic neurons via Trk and p75<sup>Lnt</sup> receptors. *J. Biol. Chem.* **271**, 21100-21107 (1996)
79. Goodman Y, Mattson MP: Ceramide protects hippocampal neurons against excitotoxic and oxidative insults, and amyloid  $\beta$ -peptide toxicity. *J. Neurochem.* **66**, 869-872 (1996)
80. Barger SW, Horser D, Furukawa K, Goodman Y, Krieglstein J, Mattoson MP: Tumor necrosis factors  $\alpha$  and  $\beta$  protect neurons against amyloid  $\beta$ -peptide toxicity: Evidence for involvement of a  $\kappa$ B-binding factor and attenuation of peroxide and  $\text{Ca}^{2+}$  accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9328-9332 (1995)
81. Carter BD, Kaltschmidt C, Kalschmidt B, Offenhauser N, Bohm-Matthaei R, Baeuerle PA, Barde YA: Selective activation of NF- $\kappa$ B by nerve growth factor through the neurotrophin receptor p75. *Science* **272**, 542-545 (1996)